

Aus dem Institut für Klinische Zytobiologie und Zytopathologie  
Direktor: Professor Doktor Roland Lill  
und der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie  
Direktor: Professor Doktor Andreas Horst Mahnken  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Vergleichende Analyse von  
basaler und stressinduzierter Expression  
sowie Lokalisation der Hitzeschockproteine  
von 70 Kilodalton Molekulargewicht  
HSPA1A und HSPA1B (Hsp70)  
bei humanen Tumorzellen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Christian Wolfgang Schink  
aus Frankenberg an der Eder  
Marburg, 2016

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der  
Philipps-Universität Marburg  
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer  
Creative Commons  
Namensnennung  
Keine kommerzielle Nutzung  
Weitergabe unter gleichen Bedingungen  
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 18.11.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Professor Doktor Helmut Schäfer

Referent: Herr Professor Doktor Ralf Jacob

Korreferentin: Frau Professor Doktor Monika Hassel

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassungen</b>	<b>1</b>
1.1	Zusammenfassung	1
1.2	Summary	3
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
2.1.	<b>Die Familie der Hitzeschockproteine mit 70 kDa Molekulargewicht</b>	<b>7</b>
2.1.1	Generelle Domänenstruktur von Chaperonen der HSP70-Familie	7
2.1.2	Molekularer Mechanismus der Bindung und Freisetzung von Substraten	9
2.2	<b>Humane Chaperone der HSP70-Familie</b>	<b>14</b>
2.3	<b>Die stressinduzierbaren Hsp70-Chaperone HSPA1A und HSPA1B</b>	<b>16</b>
2.3.1	Expression von Hsp70 bei gesunden humanen und murinen Zellen	17
2.3.2	Expressionsmuster von Hsp70 bei humanen Tumorzellen	18
2.3.3	Subzelluläre Lokalisation von Hsp70 bei humanen Tumorzellen	21
2.3.4	Extrazelluläres Hsp70 bei humanen Tumorzellen	23
2.4	<b>Problemstellung und Zielsetzung des Dissertationsprojekts</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>28</b>
3.1	<b>Geräte, Chemikalien, Reagenzien, Verbrauchsmaterial, Software</b>	<b>28</b>
3.2	<b>Zellkultur</b>	<b>35</b>
3.2.1	Zelllinien	35
3.2.2	Kultivierung	37
3.2.3	Passage	38
3.2.4	Langzeitlagerung und Rekultivierung	39
3.2.5	Hitzeschock	40
3.3	<b>Biochemische Methoden</b>	<b>41</b>
3.3.1	Zellaufschluss und Fraktionierung	41
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentrationen und Probenvorbereitung	42
3.3.3	Tricin-Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
3.3.4	Westernblot	46
3.4	<b>Fluoreszenzmikroskopie und Fluorimetrie</b>	<b>48</b>
3.4.1	Fluoreszenzmarkierung von Zielmolekülen und Fluoreszenzmikroskopie	48
3.4.2	Fluorimetrische Messung von Fluoreszenzintensitäten	51
3.5	<b>Datenerhebung, Datenauswertung und Statistik</b>	<b>52</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>54</b>
4.1	<b>Trotz unterschiedlicher basaler und stressinduzierter Expression von Hsp70 bleibt der zeitliche Verlauf der Stressantwort konstant</b>	<b>54</b>
4.1.1	Die basalen Hsp70-Expressionsintensitäten der Zelllinien sind unterschiedlich	55

4.1.2	Die Expression von Alix, Galektin-3 und Hsc70 wird bei allen drei Zelllinien, die von GAPDH nur bei den MCF7- und U2OS-Zellen durch Stress beeinflusst	59
4.1.3	Trotz unterschiedlicher Expressionsmaxima ist der zeitliche Verlauf der Hsp70-Stressantwort bei MCF7-, T47D- und U2OS-Tumorzellen vergleichbar	67
<b>4.2</b>	<b>Tumorzellen konzentrieren Hsp70 und andere Proteine auf den extrazellulären Plasmamembranseiten auf vesikulären Strukturen</b>	<b>70</b>
4.2.1	Integrale und peripheres Hsp70 sind auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran von T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen in Clustern lokalisiert	70
4.2.2	Ein nichtletaler Hitzeschock hat bei T47D-, MCF7- und U2OS-Tumorzellen keine erkennbaren Auswirkungen auf die subzelluläre Lokalisation von Hsp70	77
4.2.3	T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen exponieren neben Alix und der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase auch Centrin, GAPDH, LDH und $\alpha$ -Tubulin auf der Zelloberfläche	79
4.2.4	Hsp70 kolokalisiert auf der extraplasmatischen Seite der Zellmembran von T47D-, MCF7- und U2OS-Tumorzellen mit GAPDH sowie $\alpha$ -Tubulin und Alix	85
<b>4.3</b>	<b>Galektin-3 interagiert auf den Oberflächen von T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen mit nicht-glykosylierten Membranelementen</b>	<b>90</b>
<b>4.4</b>	<b>Auch immortalisierte HK2-Zellen exponieren neben Hsp70 auch GAPDH, LDH, <math>\alpha</math>-Tubulin und Caveolin-1 auf den Zelloberflächen</b>	<b>92</b>
<b>4.5</b>	<b>Mittels Fluorochrom-gekoppelter Substratpeptide lässt sich das auf den Oberflächen der Zellen exponierte Hsp70 nicht markieren</b>	<b>95</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>100</b>
5.1	Bei T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen ist die Stärke der Hsp70-Stressantwort abhängig vom basalen Hsp70-Expressionsniveau	100
5.2	Die Ausprägung der Hsc70-Stressantwort ist bei T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen abhängig vom basalen Hsp70-Expressionsniveau	102
5.3	Bei T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen ist der zeitliche Verlauf der Hsp70-Stressantwort unabhängig vom basalen Expressionsniveau	105
5.4	Die subzelluläre Lokalisation von Hsp70 wird bei T47D-, MCF7- und U2OS-Tumorzellen durch einen Hitzeschock nicht beeinflusst	106
5.5	Sowohl integrales als auch peripheres Hsp70 sind auf den Oberflächen von T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen in Clustern lokalisiert	109
5.6	Alix akkumuliert auf den Oberflächen von T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen ausschließlich in der Umgebung der Hsp70-Cluster	111
5.7	Die Proteincluster auf den Oberflächen der T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen stellen sehr wahrscheinlich extrazelluläre Vesikel dar	112
5.8	Centrin-, die Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase und Galektin-3 akkumulieren auf den mutmaßlichen extrazellulären Vesikel Tumorzelltyp-spezifisch	114
5.9	Das Membran-assoziierte Hsp70 ist sehr wahrscheinlich nicht aktiv	118
5.10	Zusammenfassung, Immunologische Relevanz der Ergebnisse, Implikationen für Tumordiagnostik und Tumorthherapie, Ausblick	120



---

5.10.1	Implikationen der Ergebnisse der biochemischen Analysen der basalen Hsp70-Expressionsniveaus sowie der Hsp70-Stressantworten für die Tumorthherapie	120
5.10.2	Immunologische Relevanz der Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Analysen und Implikationen der Lokalisationsmuster für die Tumordiagnostik	122
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>127</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>144</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>147</b>
<b>8.1</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>147</b>
<b>8.2</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>149</b>
<b>9</b>	<b>Anlagen</b>	<b>150</b>
<b>9.1</b>	<b>Ergänzende Abbildungen</b>	<b>150</b>
<b>9.2</b>	<b>Akademischer Lebenslauf, Veröffentlichung, Tagungsbeitrag</b>	<b>187</b>
9.2.1	Akademischer Lebenslauf	187
9.2.2	Veröffentlichung	187
9.2.3	Tagungsbeitrag	187
<b>9.3</b>	<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer</b>	<b>188</b>
<b>9.4</b>	<b>Danksagung</b>	<b>189</b>
<b>9.5</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>190</b>

# **1 Zusammenfassungen**

## **1.1 Zusammenfassung**

Im Gegensatz zu gesunden humanen Zellen weisen Tumorzellen eine erhöhte basale Expression von HSPA1A und HSPA1B auf, zweier stressinduzierbarer molekularer Chaperone mit einem Molekulargewicht von 70 Kilodalton (nachfolgend zusammenfassend als "Hsp70" bezeichnet). Außerdem exponieren sie Hsp70 als periphere oder integrale Proteine auf ihren Zelloberflächen, wobei die integrale Form als für Tumorzellen spezifisch gilt. Stressinduziert wird Hsp70 allgemein verstärkt exprimiert, was nicht nur zytoprotektive, sondern auch zytotoxische Effekte auslösen kann. Auch der Export von freiem Hsp70 und die Sekretion von Hsp70 enthaltenden extrazellulären Vesikeln werden unter Stressbedingungen intensiviert. Letzteres kann immunstimulatorische Wirkungen hervorrufen.

Grundsätzlich können die basalen sowie die stressinduzierten Expressions- und Lokalisationsmuster von Hsp70 bei einzelnen Tumorzelltypen variieren. Eine einheitliche Korrelation zwischen Expressionsintensität und Behandlungsprognose konnte bislang nicht hergestellt werden. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit MCF7-Brust-Adenokarzinom-, T47D-Brust-Duktalkarzinom- und U2OS-Osteosarkom-Zellen bezüglich basaler Expressionsintensität, Verlauf und Ausprägung der Stressantwort sowie Lokalisation von Hsp70 charakterisiert. Hierdurch sollten Unterschiede und Gemeinsamkeiten identifiziert werden, die sich als Ansatzpunkte für Tumordiagnostik und Tumorthherapie eignen könnten.

Zur biochemischen Charakterisierung der basalen und stressinduzierten Expressionsmuster von Hsp70 und anderen Proteinen wurden ungestresste und gestresste Zellen homogenisiert und mittels differentieller Zentrifugation in zellkernfreie Homogenate, Zytosol- und Membranfraktionen getrennt. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Gelelektrophorese, Westernblot und densitometrischer Quantifizierung. Hierbei zeigte sich, dass T47D- und MCF7-Zellen unter physiologischen Bedingungen deutlich mehr Hsp70 exprimierten als U2OS-Zellen. Die Höhen der basalen Expressionsniveaus bestimmten die Intensitäten der Stressantworten: Je mehr Hsp70 die Zellen unter physiologischen Bedingungen synthetisierten, desto schwächer fielen die stressinduzierten Expressionssteigerungen aus.

Davon abgesehen zeigten die Tumorzelllinien auffällige Gemeinsamkeiten. So verliefen die stressinduzierten Hsp70-Expressionsschwankungen in Zytosol- und Membranfraktionen stets vergleichbar, die Verhältnisse von zytosolischem zu Membran-assoziiertem Hsp70 blieben konstant. Die Expressionssteigerungen erreichten die jeweiligen Maxima bei allen drei Tumorzelllinien zwischen vier und sechs Stunden nach Stressexposition.

Auch die zwischen sechs und 24 Stunden auftretenden Expressionsreduktionsraten waren ähnlich ausgeprägt. Bezüglich der Expressionsmuster des konstitutiv exprimierten HSPA8 (nachfolgend als "Hsc70" bezeichnet) zeigten die T47D-Zellen hingegen Besonderheiten: Obgleich diese Zellen bereits unter physiologischen Bedingungen nur wenig Hsc70 exprimierten, reduzierten sie die Expression nach Stressexposition, während MCF7- und U2OS-Zellen die Synthese verstärkten. Dies lässt vermuten, dass zytotoxische Effekte die maximal erreichbaren Expressionsniveaus von Hsp70-Chaperonen begrenzen.

Die Analyse der subzellulären Lokalisationsmuster von Hsp70 und anderen Proteinen wurde mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie unter Verwendung unpermeabilisierter und permeabilisierter Zellen realisiert. Hierbei zeigten sich entweder keine (T47D, MCF7) oder nur geringfügige (U2OS) Unterschiede zwischen ungestressten und gestressten Zellen. Hsp70 blieb innerhalb der Zellen überwiegend gleichmäßig verteilt, die subzellulären Lokalisationsmuster blieben weitgehend konstant. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die bei anderen Tumorzelltypen beobachtete stressinduzierte nukleäre Akkumulation von Hsp70 kein genereller Bestandteil der Stressantwort ist.

Auf den Oberflächen der unpermeabilisierten Zellen kolokalisierte Hsp70 mit GAPDH und  $\alpha$ -Tubulin in sphärisch oder globulär erscheinenden Clustern von drei (MCF7) bis zehn (T47D, U2OS) Mikrometern Durchmesser. Die Formen und Größen dieser Cluster sowie das Vorhandensein von Alix in der unmittelbaren Umgebung derselben deuten darauf hin, dass es sich bei diesen um extrazelluläre Vesikel ähnlich den großen Onkosomen handeln könnte. Des Weiteren waren auch LDH, Centrin, Untereinheiten von  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen und Galektin-3 auf den Oberflächen der Tumorzellen detektierbar. Die Lokalisationsmuster einiger der letztgenannten Proteine variierten zwischen den Tumorzelllinien jedoch erheblich. Dies lässt darauf schließen, dass die Komposition der auf den vesikulären Strukturen vorhandenen Proteine für einzelne Tumorzelltypen spezifisch sein könnte.

Zusammenfassend betrachtet lassen die Ergebnisse der biochemischen Analysen vermuten, dass die Stressresistenz von Tumorzellen nicht nur durch die Höhe des basalen Hsp70-Expressionsniveaus determiniert wird. Vielmehr scheint auch die Menge des über die basale Expression hinaus noch synthetisierbaren Hsp70 eine Rolle zu spielen. Die Resultate der immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen weisen darüber hinaus darauf hin, dass die Freisetzung großer extrazellulärer Vesikel kein Merkmal bestimmter Tumorzelltypen, sondern ein relativ weit verbreitetes Phänomen sein könnte. Die Konzentration immunaktivierender Moleküle auf den Vesikeln sowie die Abschnürung derselben könnte es den Tumorzellen ermöglichen, die gegen sie gerichtete Reaktion des Immunsystems zu unterlaufen.

## 1.2 Summary

In contrast to healthy human cells, tumor cells frequently overexpress HSPA1A and HSPA1B, the two major stress-inducible molecular chaperones of 70 kilodalton molecular weight (hereinafter collectively referred to as "Hsp70"). In addition, they present Hsp70 as peripheral or integral proteins on their cell surfaces, whereby the integral form is considered to be specific for tumor cells. Stress-induced, the expression of Hsp70 is generally upregulated, which can cause cytoprotective and cytotoxic effects. Also the export of soluble Hsp70 and the secretion of extracellular vesicles containing Hsp70 are intensified under stress conditions, which can provoke immunostimulatory effects.

In general, the basal and stress-induced expression patterns as well as the subcellular localizations of Hsp70 can vary between different types of tumor cells. A clear correlation between expression intensity and treatment prognosis could not be established so far. Therefore, in this study, the breast adenocarcinoma cell line MCF7, the breast ductal carcinoma cell line T47D and the osteosarcoma cell line U2OS were characterized regarding basal expression intensity, progression and features of the stress response as well as localization of Hsp70. Hereby, differences and similarities were to be identified, which could act as starting points for tumor diagnosis and tumor treatment approaches.

To characterize the basal and heat-shock altered expression patterns of Hsp70 and other proteins, unstressed and stressed cells were homogenized and separated into nuclear-free homogenates, cytosolic and membrane fractions by differential centrifugation. The samples were analyzed by gel electrophoresis, western blot and densitometric quantification. The results revealed that MCF7 and T47D cells expressed considerably higher quantities of Hsp70 than U2OS cells under physiological conditions. The strength of the basal expression determined the intensity of the stress response: The more Hsp70 was expressed under physiological conditions, the weaker was the stress-induced expression increase.

Beside these differences, the tumor cell lines shared noticeable similarities: The temporal progression of the heat-shock induced expression fluctuations in cytosolic and membrane fractions was comparable; the ratios of cytosolic to membrane-associated Hsp70 remained constant. Furthermore, the Hsp70 expression increase reached its peak four to six hours post-stress in all tumor cell lines analyzed. Also the expression decrease rates between six and 24 hours post-stress were comparable. However, regarding the expression pattern of the constitutively expressed HSP70-family member HSPA8 (hereinafter referred to as "Hsc70"), the T47D cells showed interesting particularities: Although these cells already

expressed only low amounts of Hsc70 under physiological conditions, they reduced the expression in response to stress-exposure, whereas the MCF7 and the U2OS cells reinforced the synthesis. Thus, it seems likely that the maximal achievable expression levels of Hsp70-chaperones are limited by cytotoxic side effects.

The analysis of the subcellular localization patterns of Hsp70 and other proteins was accomplished by indirect immunofluorescence microscopy using non-permeabilized and permeabilized cells. The results indicated no (T47D, MCF7) or just slight (U2OS) differences between unstressed and stressed cells. Hsp70 remained more or less evenly distributed within the cells; the subcellular localization patterns remained essentially constant. Accordingly, it can be assumed that the stress-induced nuclear accumulation of Hsp70, observed in case of other tumor cell lines, is not a general part of the stress response.

On the surfaces of the non-permeabilized cells, Hsp70, GAPDH and  $\alpha$ -Tubulin colocalized in clusters of spherical or globular appearance with three (MCF7) to ten (T47D, U2OS) micrometer diameter. Size and shape of these clusters as well as the presence of Alix exclusively in immediate vicinity to them suggest that they may represent extracellular vesicles similar to the large oncosomes. Furthermore, also LDH, Centrin, subunits of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases and Galectin-3 were detectable on the cell surfaces. However, the localization patterns of some of the latter proteins differed between the cells lines to a considerable degree. Therefore, it can be assumed that the composition of the proteins exposed on the vesicular structures might be specific for certain types of tumor cells.

Taken together, the results of the biochemical analyses lead to the assumption that the stress resistance of tumor cells is not solely depending on the intensity of the basal Hsp70 expression. Rather, it appears that also the amount of Hsp70 which can be synthesized in addition to the basal expression level might play a role. The results of the immunofluorescence microscopic analyses suggest moreover that the shedding of large vesicles is not a special characteristic of certain tumor cell types, but a relatively widespread phenomenon. The concentration of immunoactivating molecules on these vesicles and their release could enable tumor cells to circumvent the antitumor response of the immune system.

## 2 Einleitung

Alle Organismen sind mit ständig wechselnden externen oder internen Einflüssen konfrontiert, die bis zu einem gewissen Grad dauerhaft toleriert werden können. Überschreiten Dauer oder Intensität einer Beeinflussung jedoch das Niveau, an welches ein bestimmter Organismus jeweils angepasst ist, oder ändern sich Umweltbedingungen ungewöhnlich schnell, reagieren Organismen auf zellulärer Ebene mit strukturellen und funktionellen Adaptionsvorgängen. Letzteres wird allgemein als zelluläre Stressantwort bezeichnet. Die ursächlichen Einflüsse werden dementsprechend Stressfaktoren oder Stressoren genannt.

Den Grundstein für die Erforschung der Stressantwort legte Ferruccio Ritossa im Jahr 1962 mit einer zunächst als "für die wissenschaftliche Gemeinschaft irrelevant" bezeichneten Studie (Ritossa, 1996). Er beobachtete bei Larven der Taufliege *Drosophila busckii* die Dekondensation gewisser Bereiche von Polytänychromosomen infolge kurzfristiger Temperaturerhöhung (Ritossa, 1962). Erst zwölf Jahre später demonstrierten Tissières *et al.*, dass die Neubildung dieser Strukturen mit dem Beginn der Synthese einer begrenzten Anzahl von Proteinen korreliert (Tissières *et al.*, 1974). Letztere werden aufgrund des für die Entdeckung maßgeblichen Stressfaktors bis heute als "Hitzeschockproteine" (HSPs) bezeichnet, obgleich bereits Ritossa gezeigt hatte, dass sich die von ihm beschriebenen Effekte bei *Drosophila*-Larven nicht nur durch Temperaturerhöhung, sondern auch mit Chemikalien wie Dinitrophenol oder Natriumsalicylat induzieren lassen (Ritossa, 1964).

In den folgenden Jahren war die Forschung zunächst auf die Aspekte Genstruktur und Regulation fokussiert (Lindquist, 1986). Hierbei zeigte sich, dass die für bestimmte HSPs kodierenden Gene sowie deren regulatorische Elemente evolutionär zumeist hoch konserviert sind. Auch wurde bald klar, dass viele HSPs direkt an der Faltung anderer Proteine beteiligt oder in die Aufrechterhaltung beziehungsweise die Wiederherstellung der dreidimensionalen Konformation derselben involviert sind (Becker und Craig, 1994). In Anlehnung an das englische Wort für "Anstandsdamen" bezeichnete man diese Polypeptidkettenbindenden molekularen Faltungshelfer daher als Chaperone (Ellis, 1987).

Auf struktureller Ebene erwies sich die Gruppe der HSPs hingegen als vergleichsweise heterogen. Daher teilte man sie anhand ihrer ungefähren, in Kilodalton (kDa) ausgedrückten, atomaren Massen und Funktionen in Familien ein (Tabelle 2.1). Zu diesen gehören etwa die aus bis zu 14 Untereinheiten bestehenden Proteinkomplexe der HSP60-Familie, aber auch einfacher strukturierte HSPs, wie die nur in dimerisierter Form aktiven Hsp90-Chaperone oder die als Monomere funktionsfähigen Hsp70-Proteine.

**Tabelle 2.1: Familien der Hitzeschockproteine sowie Beispiele für Nomenklatur, Lokalisation und Funktion einzelner Proteine bei *Escherichia coli* (*E. coli*), *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Pisum sativum* (*P. sativum*) und *Homo sapiens* (*H. sapiens*). Nach Jolly und Morimoto, 2000 sowie Zorzi und Bonvini, 2011; abgewandelt. ER = Endoplasmatisches Retikulum, ATP = Adenosintriphosphat.**

<b>Familie</b>	<b>Organismus</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Funktionen / Beteiligungen</b>
<b>HSP100</b>	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i>	ClpA, B, C Hsp104	Zytosol Zytosol	Stresstoleranz; Resolubilisierung von hitzeinaktivierten Proteinen aus Aggregaten;
<b>HSP90</b>	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>H. sapiens</i>	HtpG Hsp83 Hsp90 GRP94	Zytosol Zytosol Zytosol ER	Autoregulation der Stressantwort; Signaltransduktion; Rückfaltung von Proteinen; Zellzyklus, Zellproliferation; Aufrechterhaltung der Integrität von Mitochondrien;
<b>HSP70</b>	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i>  <i>H. sapiens</i>	DnaK Ssa1, 2, 3, 4 Ssb1, 2 Kar2 Ssc1 Hsc70 Hsp70 BIP mHsp70	Zytosol Zytosol Zytosol ER Mitochondrien Zytosol, Nukleus Zytosol, Nukleus ER Mitochondrien	Autoregulation der Stressantwort; Signaltransduktion; Neu- oder Rückfaltung von Proteinen; Rückfaltung denaturierter Proteine; Zellzyklus, Zellproliferation; Interaktion mit neusynthetisierten Polypeptidketten; interorganeller Transport; Unterstützung antiapoptotischer Mechanismen bei Tumorzellen; Präsentation von Antigenen; Replikation von Lambda-Phagen;
<b>HSP60</b>	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>P. sativum</i> <i>H. sapiens</i>	GroEL Hsp60 Cpn60 Hsp60	Zytosol Mitochondrien Chloroplasten Mitochondrien	Unterbindung der Aggregation und Rückfaltung denaturierter Proteine; Proteolyse (möglicherweise Ko-Faktor); Assemblierung von Bakteriophagen und RuBisCO;
<b>HSP40</b>	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>H. sapiens</i>	DnaJ Ydj1 Hdj1, 2	Zytosol Zytosol, Nukleus Zytosol, Nukleus	Ko-Chaperone für Proteine der HSP70-Familie (Steigerung ATP-Hydrolyserate, Beschleunigung Substratfreisetzung);
<b>kleine HSPs</b>	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>H. sapiens</i>	IbpA, B Hsp27 Crystallin Hsp27	Zytosol Zytosol Zytosol Zytosol	Unterdrückung von Aggregation und Hitzeinaktivierung bei Proteinen; Thermotoleranz-Vermittlung (Mikrofilament-Stabilisierung); antiapoptotische Aktivitäten;

Die Regulation der Stressantwort stellte sich als den spezifischen biologischen Charakteristika einzelner Organismen entsprechend und somit insgesamt betrachtet als divers heraus (Lindquist und Craig, 1988). So musste man feststellen, dass einige der ursprünglich als HSPs klassifizierten Proteine tatsächlich bereits unter physiologischen Bedingungen konstitutiv exprimiert und im Rahmen der Stressantwort lediglich verstärkt synthetisiert werden. Die Expression anderen HSPs erwies sich bei Stressexposition als konstant oder bei Auftreten bestimmten Stressfaktoren sogar als reprimierbar. Darüber hinaus beobachtete man, dass bei komplexeren Eukaryoten HSPs vielfach Entwicklungsstadium- und Gewebetyp-spezifisch exprimiert werden (Morange *et al.*, 1984). Beispielsweise demonstrierten D'Souza und Brown, dass die Expression stressinduzierbarer Vertreter der HSP70-Familie während der frühen postnatalen Entwicklungsphasen in den zerebralen Hemisphären der Gehirne von *Rattus norvegicus* ansteigt (D'Souza und Brown, 1998). Die Expression im

Kleinhirn bleibt hingegen konstant. Morimoto und Fodor beschrieben, dass Lymphozyten von *Gallus gallus domesticus* nach einem Hitzeschock Hsp90- und Hsp70-Proteine sowie kleine HSPs verstärkt exprimieren, Retikulozyten hingegen lediglich die Expression von Vertretern der HSP70-Familie intensivieren (Morimoto und Fodor, 1984).

Inzwischen hat sich gezeigt, dass die Hauptfunktionen vieler HSPs in der Erkennung und Stabilisierung partiell gefalteter Intermediate sowie in der Rückfaltung denaturierter Proteine bestehen (Ellis und Hemmingsen, 1989; Beckmann *et al.*, 1990). Darüber hinaus sind HSPs aber in eine Vielzahl von Prozessen involviert, welche für die allgemeine Zellviabilität von essentieller Bedeutung sind. Hierzu gehören unter anderem die Unterbindung der Aggregation von Proteinen (Pelham, 1986), der Transport von Vorläuferproteinen über Membranen (Kang *et al.*, 1990), die Assemblierung oder Disassemblierung von Proteinkomplexen (Chappell *et al.*, 1986) sowie die Proteindegradation (Straus *et al.*, 1988) und die Modulation der Stressantwort (Tilly *et al.*, 1983; Nelson *et al.*, 1992).

## **2.1 Die Familie der Hitzeschockproteine mit 70 kDa Molekulargewicht**

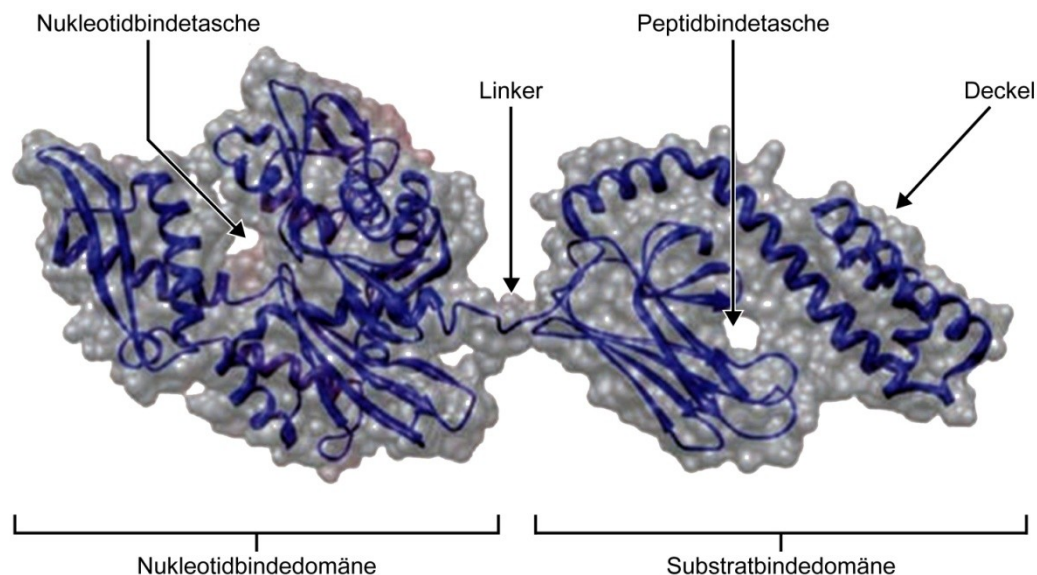
Die Familie der HSPs mit einem Molekulargewicht von etwa 70 kDa umfasst eine Gruppe molekularer Chaperone, die bei allen bislang diesbezüglich charakterisierten Organismen nachgewiesen wurden (Lindquist, 1986; Lindquist und Craig, 1988). Vergleichende Analysen der Gene dieser HSPs lieferten eines der ersten überzeugenden Beispiele für evolutionäre Genkonversion, sie gelten als die evolutionär höchstkonservierten Gene überhaupt (Daugaard *et al.*, 2007). So weisen beispielsweise einige der von *Homo sapiens* und *Drosophila melanogaster* exprimierten Chaperone der HSP70-Familie Sequenzidentitäten von bis zu 73 % auf, während die Hsp70-Proteine von *Homo sapiens* und *Escherichia coli* im Allgemeinen Sequenzidentitäten von etwa 50 % zeigen (Lindquist und Craig, 1988).

### **2.1.1 Generelle Domänenstruktur von Chaperonen der HSP70-Familie**

Chaperone der HSP70-Familie gliedern sich grundsätzlich in zwei strukturell unterschiedlichen Domänen (Abbildung 2.1): Eine evolutionär hochkonservierte, N-terminale ATPase- beziehungsweise Nukleotidbindedomäne (NBD) von 44 bis 45 kDa sowie eine eher variable, C-terminale Peptid- beziehungsweise Substratbindedomäne (SBD) von 25 bis 27 kDa (Chappell *et al.*, 1987; Milarski und Morimoto, 1989; Wang *et al.*, 1993; Gragerov *et al.*, 1994; Vogel *et al.*, 2006b). Beide Domänen sind über einen ebenfalls hoch konservierten Bereich regulatorischer Funktion miteinander verknüpft (gemäß der entsprechenden englischen Bezeichnung nachfolgend "Linker" genannt). Die dreidimensionalen Strukturen isolierter Domänen wurden am Beispiel der Hsp70-Proteine diverser Spezies unter ande-



rem mittels Proteinkristallographie bereits aufgeklärt. Entsprechende Daten eines vollständigen und funktionsfähigen Vertreters der HSP70-Familie liegen jedoch nur für Hsp70-Proteinen mit gebundenen Substraten beziehungsweise Nukleotiden oder für Hsp70-Varianten vor, welche lediglich um einige Aminosäuren verkürzte Domänen umfassen (Jiang *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2008; Bertelsen *et al.*, 2009; Kityk *et al.*, 2012; Qi *et al.*, 2013a).



**Abbildung 2.1: Domänenstruktur von Hsp70 am Beispiel von DnaK.** Chaperone der HSP70-Familie bestehen aus einer C-terminalen Nukleotidbindedomäne (NBD) sowie einer N-terminalen Substratbindedomäne (SBD), welche über einen flexiblen, hydrophoben Bereich (Linker) miteinander verknüpft sind. Im Falle des von *Escherichia coli* exprimierten DnaK umfasst die NBD die Aminosäuren eins bis 385, der Linker die Aminosäuren 386 bis 396 und die SBD die Aminosäuren 397 bis 638 (Chiappori *et al.*, 2016). Abgebildet ist die räumliche Anordnung der Subdomänen von DnaK im Komplex mit Adenosindiphosphat und Substrat als Überlagerung von Bänder- (blau) und Oberflächenmodell (grau). Hierbei ist die Nukleotidbindetasche der NBD zugänglich, die als Deckel fungierende  $\alpha$ -Subdomäne der SBD geschlossen. Zur übersichtlicheren Darstellung sind ADP und Substrat nicht gezeigt. Nach Kampinga und Craig, 2010; abgewandelt.

Die NBD vermittelt die allosterische Kontrolle der Substratbindung (Abbildungen 2.1 und 2.2). Diese besteht aus zwei großen, globulären Subdomänen (I, II), die aus je zwei Untereinheiten (A, B) gebildet werden und durch eine tiefe Nukleotidbindespalte voneinander getrennt sind (Flaherty *et al.*, 1990; Mayer und Bukau, 2005). Adenosintriphosphat- (ATP-) Nukleotide werden im Komplex mit je einem Magnesium- ( $Mg^{2+}$ -) und zwei Kalium- ( $K^{+}$ -) Ionen in der Spalte gebunden und interagieren mit allen vier Untereinheiten (IA, IB, IIA, IIB), bevor sie in einer Adenosin-Nukleotidbindetasche fixiert werden (Mayer und Bukau, 2005). Die Subdomänen sind höchst flexibel und können ihre Position relativ zueinander so verschieben, dass die Spalte geöffnet oder geschlossen wird (Zhang und Zuiderweg, 2004). Die SBD hingegen ermöglicht die Bindung hydrophober Bereiche von Polypeptiden (vergleiche Abbildungen 2.1 und 2.2). Sie besteht ebenfalls aus zwei Subdomä-

nen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), deren wesentliche Sekundärstrukturelemente sich deutlich unterscheiden. Die N-terminale  $\beta$ -Subdomäne ist aus zwei antiparallel übereinanderliegenden, jeweils viersträngigen  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut (Zhu *et al.*, 1996). Diese bilden einen Kanal, in welchem Substratpeptide in gestreckter Form gebunden werden. Form und Länge des Substratbindekanals erlauben die Interaktion mit fünf Aminosäuren des jeweiligen Substrats. Eine zentrale, hydrophobe Tasche ermöglicht die Bindung von Resten mit hydrophoben, sperrigen Seitenketten, wie beispielsweise Leucin. Im Falle gebundener Substrate ist die  $\beta$ -Subdomäne relativ starr, in Substrat-freier Form aber beweglich (Stevens *et al.*, 2003).

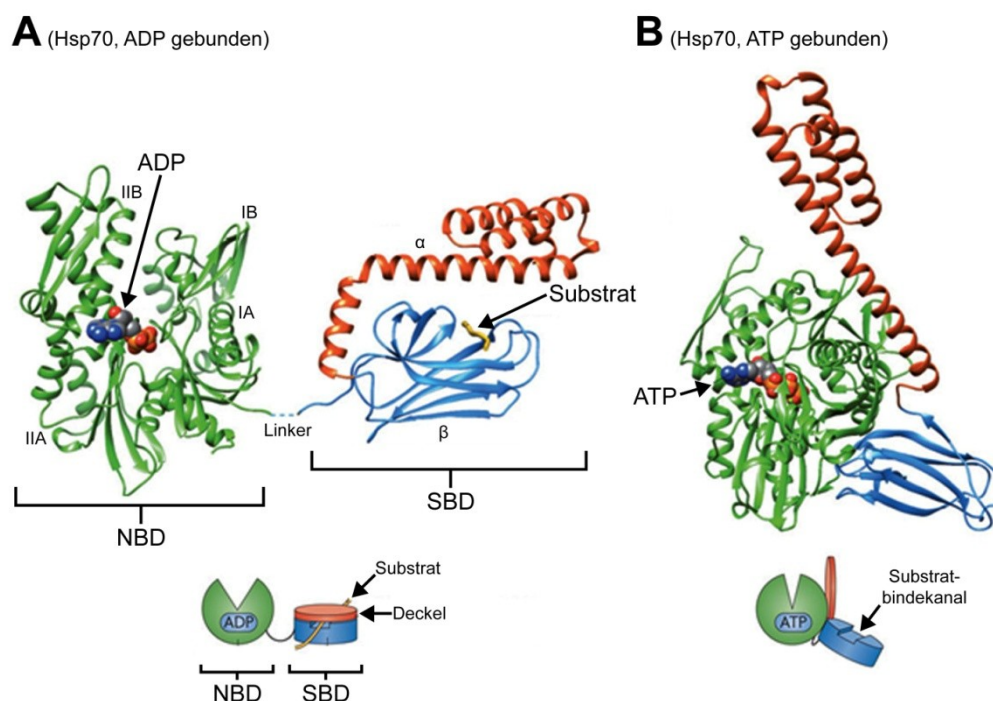
Die C-terminale  $\alpha$ -Subdomäne der SBD umfasst fünf  $\alpha$ -Helices, welche nicht direkt mit Substraten interagieren und höchst flexibel sind (Zhu *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 2000). Die Subdomäne ist einerseits für die Stabilisierung von Hsp70-Substrat-Komplexen essentiell (Moro *et al.*, 2004). Daher wird angenommen, dass diese als eine Art Deckel für den Substratbindekanal fungiert, der zum Austausch von Substraten geöffnet werden muss. Darüber hinaus ist die  $\alpha$ -Subdomäne jedoch für die Rückfaltung denaturierter Substrate erforderlich. Ohne diese können bei gebundenen Proteinen keine Konformationsänderungen induziert werden (Schlecht *et al.*, 2011). Dementsprechend wird von einer direkten Beteiligung der  $\alpha$ -Subdomäne an der Chaperon-Funktion von Hsp70 ausgegangen, obgleich der zugrundeliegende Mechanismus noch weitgehend unverstanden ist.

Der NBD und SBD verknüpfende Bereich hydrophoben Charakters besteht - je nach betrachtetem Hsp70 - aus etwa einem Dutzend Aminosäuren (Vogel *et al.*, 2006b; Aprile *et al.*, 2013; Chiappori *et al.*, 2016). Dieser Linker ist höchst flexibel und enthält ein Leucin-reiches Strukturmotiv, welches innerhalb der HSP70-Familie besonders hoch konserviert ist. Er ist sowohl an der allosterischen Kommunikation zwischen den beiden Hsp70-Domänen beteiligt, als auch in die Rekrutierung von Ko-Chaperonen der HSP40-Familie involviert (Swain *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2011). Darüber hinaus ist er für Bildung von Hsp70-Polymeren essentiell (Aprile *et al.*, 2013). Hierbei interagiert der Linker eines der beteiligten Hsp70-Chaperone mit der SBD eines weiteren Chaperons, wodurch nicht nur Dimere, sondern auch höhere Oligomere gebildet werden können.

### **2.1.2 Molekularer Mechanismus der Bindung und Freisetzung von Substraten**

Zentrales Element der Chaperon-Funktion von Hsp70 ist die transiente Interaktion der SBD mit kurzen, hydrophoben Segmenten von Substraten (Mayer und Bukau, 2005). Diese wird durch den Wechsel der SBD zwischen einer offenen und einer geschlossenen Konformation ermöglicht, ausgelöst durch Änderungen der räumlichen Struktur der NBD

(Abbildung 2.2). Im Nukleotid-freien oder Adenosindiphosphat- (ADP-) gebundenen Zustand liegt das Chaperon zumeist in einer gestreckten Konformation vor (Abbildung 2.2 A): Der die NBD mit der SBD verknüpfende Linker ist gedehnt und gegenüber dem umgebenden Milieu exponiert (Flaherty *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 1996). Die Nukleotidbindespalte der NBD ist geöffnet, der Deckel der SBD geschlossen und das Substrat im Substratbindekanal fixiert. Im ATP-gebundenen Zustand hingegen ist die Konformation von Hsp70 für gewöhnlich kompakter (Abbildung 2.2 B): Der Linker ist gewinkelt und nur noch teilweise zugänglich (Kityk *et al.*, 2012). Die Nukleotidbindespalte der NBD ist geschlossen, der Deckel der SBD geöffnet und beide Subdomänen der SBD mit der NBD assoziiert.



**Abbildung 2.2: Konformation von Hsp70 im ADP- und im ATP-gebundenen Zustand.** Ist ADP gebunden (A), sind Nukleotidbindedomäne (NBD) und Substratbindedomäne (SBD) räumlich voneinander getrennt, der verknüpfende Bereich (Linker) ist gestreckt. Die aus den Subdomänen I und II beziehungsweise deren Untereinheiten A und B gebildete Nukleotidbindespalte der NBD (grün) ist geöffnet. Die als Deckel der SBD fungierende  $\alpha$ -Subdomäne (rot) ist über Wasserstoff- und Salzbrücken mit der  $\beta$ -Subdomäne (blau) verbunden, das Substrat (gelb) im Substratbindekanal fixiert. Infolge der Freisetzung von ADP und der Bindung von ATP schließt sich die Nukleotidbindespalte der NBD, wodurch auf deren Oberfläche eine Bindestelle für den Linker generiert wird. Die Bindung desselben induziert Interaktionen beider Subdomänen der SBD mit verschiedenen Bereichen der NBD und damit die Freisetzung des Substrats sowie die Überführung des Chaperons in die ATP-gebundene Konformation (B). In diesem Zustand sind SBD und NBD miteinander assoziiert, ist der Deckel geöffnet und der Substratbindekanal liegt frei. Die Abbildung zeigt Bändermodelle von Hsp70, jeweils kombiniert mit Kalottenmodellen der gebundenen Nukleotide, sowie darunter schematische Zeichnungen der entsprechenden Konformationen. Nach Saibil, 2013; abgewandelt.

Diese beiden Konformationen stellen jedoch lediglich Maximalzustände dar. So kann die NBD in Abwesenheit von Nukleotiden sowohl in geöffneter als auch in geschlossener

Konformation vorliegen (Shida *et al.*, 2010). Ähnliches gilt für die SBD, die beispielsweise im Falle des bakteriellen DnaK im ATP-gebundenen Zustand nur bei etwa 60 % der Chaperone tatsächlich geöffnet ist (Vogel *et al.*, 2006a). Darüber hinaus kann sich der Deckel der SBD auch in Abwesenheit von Nukleotiden öffnen oder schließen. Daher sind Hsp70-Chaperone zur Bindung von Substraten nicht zwingend auf ATP angewiesen. Dieses ist vielmehr für den Chaperon-Zyklus von essentieller Bedeutung.

In der ADP-gebunden oder Nukleotid-freien Konformation ist die Affinität von Hsp70 zu Substraten hoch, Bindung und Freisetzung derselben erfolgen langsam (Mayer und Bukau, 2005). Im Falle der ATP-gebundenen Form ist die Substrataffinität hingegen gering, Bindung und Freisetzung erfolgen jedoch schnell. Dementsprechend ist die ATP-Hydrolyse der die Geschwindigkeit der Substratumsetzung bestimmende Schritt. Die Bindung von Substraten stimuliert zwar die Hydrolyse, wodurch die Interaktion mit Substraten stabilisiert wird, jedoch ist die generelle ATP-Hydrolyserate von Hsp70 gering. Daher verläuft der Übergang von der ATP- in die ADP-gebundene Konformationen sehr langsam. So ereignen sich im Falle von DnaK spontane Übergänge von der Nukleotid-freien oder der ADP-gebundenen in die ATP-gebundene Konformation nur etwa alle 16 Minuten (Vogel *et al.*, 2006a). Der infolge spontaner ATP-Hydrolyse auftretende Übergang vom ATP- in den ADP-gebundenen Zustand hingegen benötigt bis zu 30 Minuten. Zur optimalen Funktion sind Hsp70-Chaperone daher auf die Unterstützung von J-Proteinen und Nukleotid-Austausch-Faktoren angewiesen (gemäß der englischen Bezeichnung "*Nucleotide Exchange Factors*" nachfolgend mit "NEFs" abgekürzt; vergleiche Abbildung 2.3).

Die ATP-Hydrolyse wird durch Proteine einer heterogenen Familie von Ko-Chaperonen stimuliert, die als J-Proteine bezeichnet werden, aber auch unter dem Synonym Hsp40 bekannt sind (Kampinga und Craig, 2010). Charakteristisch für diese Proteine ist eine Konsensussequenz von etwa 70 Aminosäuren Länge, die in Anlehnung an das von *Escherichia coli* exprimierte DnaJ als J-Domäne bezeichnete wird. Diese Domäne interagiert sowohl mit der NBD als auch mit dem Linker von Hsp70, wodurch die ATP-Hydrolyserate bis zu neunhundertfach beschleunigt werden kann (Pierpaoli *et al.*, 1998). Zellen verfügen für gewöhnlich nur über einige wenige verschiedene Hsp70-Chaperone, jedoch eine Vielzahl unterschiedlicher J-Proteine (Kampinga und Craig, 2010). So sind im Falle von *Homo sapiens* dreizehn Vertreter der HSP70-Familie bekannt, aber 41 J-Proteine beschrieben.

Hsp70-Chaperone sind generell nicht für bestimmte Proteinsubstrate spezifisch, sondern binden - je nach betrachtetem Vertreter der HSP70-Familie - hydrophobe Aminosäuresequenzen mit unterschiedlicher Affinität (Gragerov und Gottesman, 1994). Entsprechende

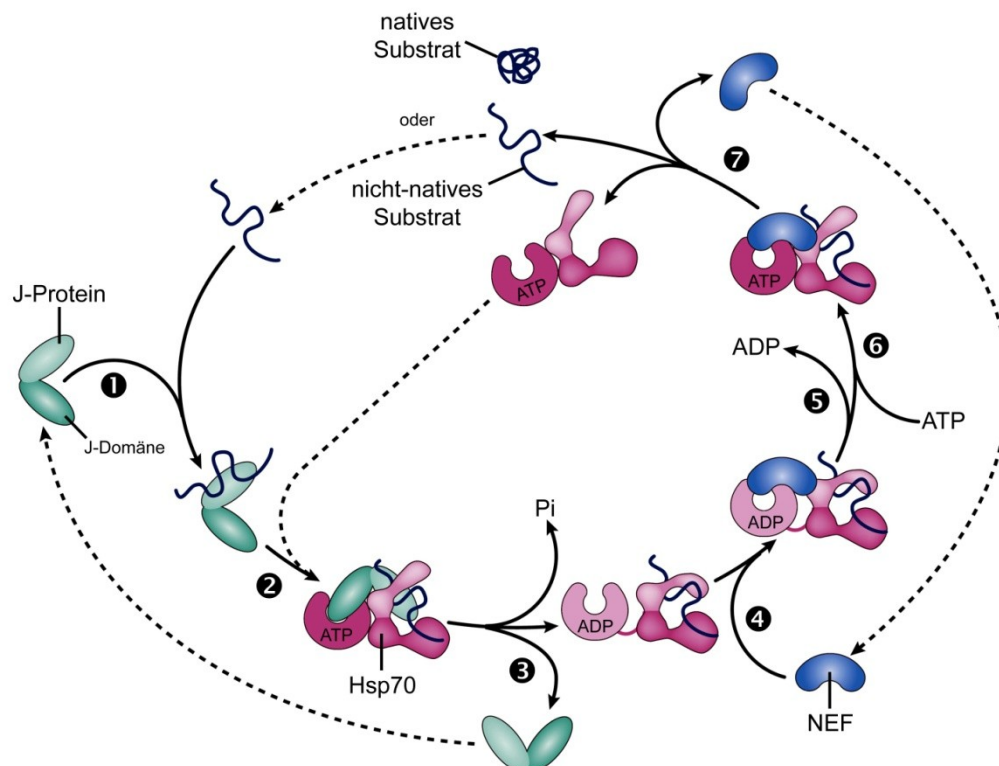
Sequenzen können jedoch in allen Proteinen enthalten sein, weshalb Hsp70-Chaperone im Allgemeinen über ein sehr breites Substratspektrum verfügen (Rüdiger *et al.*, 1997). Interessanterweise können einige J-Proteine nicht nur selbst Proteinsubstrate binden, sondern darüber hinaus auch das Substratspektrum von Hsp70 beeinflussen (Misselwitz *et al.*, 1998). Daher wird angenommen, dass die Substratspezifität einzelner Vertreter der Hsp70-Familie tatsächlich primär durch die J-Proteine determiniert wird.

Im Gegensatz zu J-Proteinen stimulieren NEFs die Freisetzung von ADP und verfügen nicht über eine charakteristische Domäne für die Interaktion mit Hsp70 (Kampinga und Craig, 2010; Bracher und Verghese, 2015). Bislang wurden vier Familien von NEFs identifiziert, die strukturell nicht miteinander verwandt sind. NEFs interagieren grundsätzlich mit der NBD von Hsp70 und katalysieren den Nukleotidaustausch auf zum Teil unterschiedliche Weise, wodurch bis zu neunhundertfache Steigerungen der ADP-Dissoziationsraten möglich sind (Gässler *et al.*, 2001). Bei Bakterien sowie in den Kompartimenten eukaryotischer Zellen bakteriellen Ursprungs sind nur NEFs der GrpE-Familie vorhanden (Bracher und Verghese, 2015). Bei Eukaryoten sind in Zytosol und Endoplasmatischem Retikulum überdies NEFs der Bag- sowie HspBP1/Sil1- und Hsp110/Grp170-Familien vertreten. Die bakteriellen NEFs der GrpE- sowie die eukaryotischen NEFs der Bag-Familie interagieren mit den IB- und IIB-Untereinheiten der NBD und initiieren dadurch eine Rotation der IIB-Untereinheit, welche die Nukleotidbindespalte öffnet (Sousa und Lafer, 2006). NEFs der HspBP1/Sil1-Familie interagieren ebenfalls mit diesen beiden Untereinheiten, induzieren dabei aber eine laterale Verschiebung derselben.

Die NEFs der Hsp110/Grp170-Familie dienen nicht nur der Beschleunigung der ADP-Freisetzung durch Hsp70, sondern stellen vielmehr selbst Chaperone dar (Bracher und Verghese, 2015). Die Domänenarchitektur von Hsp110/Grp170-Proteinen ähnelt jener der Hsp70-Chaperone, weshalb diese ursprünglich der HSP70-Familie zugerechnet wurden. NEFs dieser Familie zeigen zwar ATPase-Aktivität, etablieren aber keinen Nukleotid-abhängigen Chaperon-Zyklus. Darüber hinaus sind einige der Hsp110/Grp170-Proteine stressinduzierbar und können die Aggregation fehlgefalteter Proteine verhindern (Oh *et al.*, 1999). Daher wird derzeit davon ausgegangen, dass die Hauptfunktion dieser NEFs darin besteht, ungefaltete oder partiell denaturierte Substrate so lange zu stabilisieren, bis diese durch Hsp70-Chaperone prozessiert werden können.

Die aus der Interaktion von J-Proteinen und NEFs mit Hsp70 resultierenden Konformationsänderungen und deren Auswirkungen auf Substrat-Interaktionen und Nukleotid-Austausch sind bislang nur ansatzweise charakterisiert. Etwa für das Zusammenspiel des

Hsp70-Chaperons DnaK mit J-Proteinen des DnaJ-Typs und NEFs der GrpE-Familie konnte jedoch bereits ein sogenanntes "kanonisches Ablaufmodell" etabliert werden (Abbildung 2.3). Hierbei erfolgt die Initiation des Chaperon-Zyklus durch J-Proteine, welche fehlgefaltete Substrate binden und deren Aggregation verhindern (Kampinga und Craig, 2010). Danach interagieren die J-Proteine mit Hsp70-Chaperonen in ATP-gebundener Konformation, übertragen die Substrate auf dieselben und stimulieren deren ATPase-Aktivität. Der nachfolgende Austausch von ADP durch ATP hingegen wird durch NEFs stimuliert und resultiert in der Freisetzung der Substrate. Da die Zusammenarbeit von Hsp70 mit J-Proteinen und NEFs für eine schnelle Substratumsetzung erforderlich ist, bezeichnet man diese drei Komponenten auch als Hsp70-Kernmaschinerie.

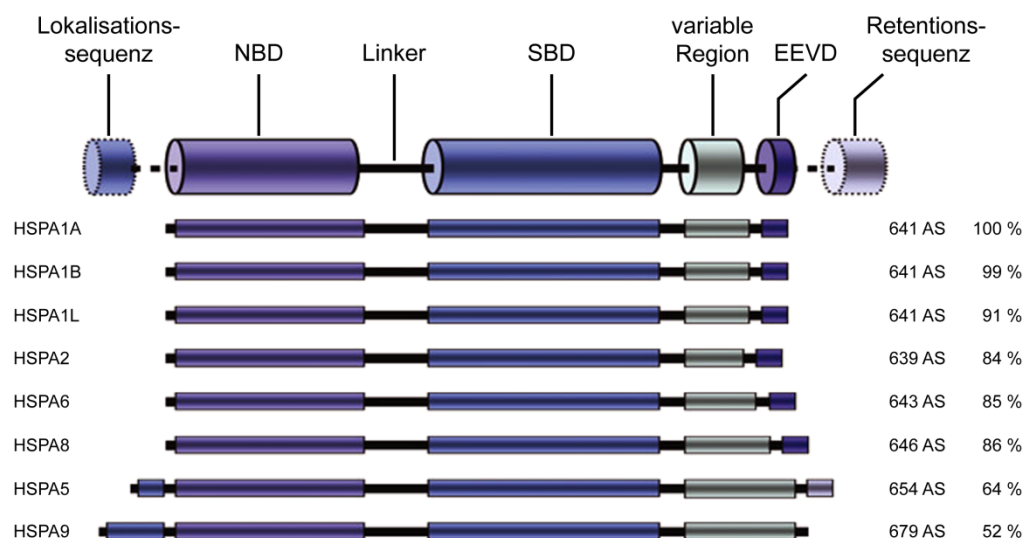


**Abbildung 2.3: Ablauf des kanonischen Chaperon-Zyklus am Beispiel der Hsp70-Kernmaschinerie von *Escherichia coli*.** Ein J-Protein (DnaJ, türkis) bindet ein ungefaltetes oder fehlgefaltetes Substrat mittels seiner Substratbindedomäne (SBD) ❶ und ein ATP-gebundenes Hsp70-Chaperon (DnaK, rosa) mittels seiner J-Domäne ❷. Dies ermöglicht eine schnelle, aber transiente Interaktion des Substrates mit dem Substratbindekanale der SBD von Hsp70. Die folgende Stimulation der ATP-Hydrolyse durch J-Protein und Substrat initiiert den Übergang von Hsp70 aus der ATP- in die ADP-gebundene Konformation: Der Deckel schließt sich über dem Substratbindekanale, wodurch die Interaktion von Hsp70 und Substrat stabilisiert wird und das J-Protein aus dem Komplex entlassen wird ❸. Daraufhin kann Hsp70 von einem Nukleotid-Austausch-Faktor (NEF) gebunden werden, dessen Affinität für Hsp70-ADP höher ist, als die für Hsp70-ATP ❹. Durch die Bindung des NEFs (GrpE, blau) wird eine Konformationsänderung der Nukleotidbindedomäne (NBD) von Hsp70 induziert, aus welcher die Dissoziation des Nukleotids resultiert ❺. Infolgedessen bindet Hsp70 freies ATP ❻ und geht in die entsprechende Konformation über, wobei NEF und Substrat freigesetzt werden ❼. Kann das Substrat im Rahmen eines ersten Chaperon-Vorgangs nicht in die native Konformation überführt werden, können dessen exponierte hydrophobe Bereiche nach der Freisetzung erneut durch ein J-Protein gebunden werden und der Chaperon-Zyklus beginnt erneut. Nach Kampinga und Craig, 2010; abgewandelt.



## 2.2 Humane Chaperone der HSP70-Familie

Prokaryoten verfügen nur über eine sehr begrenzte Anzahl von Genen, die für Chaperone der HSP70-Familie kodieren. Beispielsweise exprimiert *Escherichia coli* nur drei Vertreter derselben (Genevaux *et al.*, 2007). Bei Eukaryoten liegt die Anzahl der *hsp70*-Gene grundsätzlich deutlich höher (Daugaard *et al.*, 2007; Kampinga *et al.*, 2009). So verfügen etwa einzellige Fungi wie *Saccharomyces cerevisiae* über etwa acht und komplexere Mammalia wie *Mus musculus* über mindestens elf Hsp70-homologe Proteine. Im Falle des Genoms von *Homo sapiens* wird derzeit davon ausgegangen, dass dieses - exklusive diverser vermeintlicher Pseudogene - zumindest 13 Sequenzen enthält, welche die Expression vollumfänglich funktionsfähiger Hsp70-Chaperone ermöglichen (Brocchieri *et al.*, 2008). Allgemein sind die für subzelluläre Kompartimente bakterieller Herkunft typischen Hsp70-Chaperone eukaryotischer Zellen näher mit den bakteriellen Vertretern der HSP70-Familie verwandt, als mit den rein eukaryotischen Isoformen. Letzteres spiegelt sich unter anderem in einer komplizierteren Domänenarchitektur wider (Abbildung 2.4).



**Abbildung 2.4: Vergleich der Domänenarchitektur humaner Hsp70-Chaperone.** Wie alle Vertreter der HSP70-Familie weisen auch die humanen Hsp70-Homologe über flexible Linker verknüpften Nukleotidbindedomänen (NBD) und Substratbindedomänen (SBD) sowie C-terminale variable Regionen auf. Bei überwiegend zytosolisch lokalisierten humanen Hsp70-Isoformen wie HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L, HSPA2, HSPA6 und HSPA8 enthalten die Glycin-Prolin-reichen, variablen Regionen ein Glutaminsäure-Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure- (EEVD-) Strukturmotiv. Dieses ist für eukaryotische Hsp70-Proteine charakteristisch und in die Interaktion mit bestimmten Ko-Chaperonen sowie anderen HSPs involviert. Das EEVD-Motiv fehlt Isoformen, die für einzelne subzelluläre Kompartimente typischen sind. Diese weisen im Gegensatz zu den zytosolischen Varianten entsprechende Zielsteuerungssequenzen auf. So verfügt sowohl HSPA5, dessen Vorhandensein gemeinhin auf das Endoplasmatische Retikulum begrenzt ist, als auch das mitochondriale HSPA9 über N-terminale Lokalisationssequenzen. HSPA5 besitzt darüber hinaus eine C-terminale Retentionssequenz, welche die Freisetzung aus dem Endoplasmatische Retikulum verhindert. Die Abbildung zeigt eine vereinfachte, lineare Darstellung der genannten Domänen und Bereiche. Zusätzlich angegeben sind die Längen der Aminosäureketten (AS) sowie die prozentualen Sequenzübereinstimmungen der einzelnen Isoformen mit dem stressinduzierbaren HSPA1A. Nach Daugaard *et al.*, 2007; abgewandelt.

Obgleich der grundsätzliche Mechanismus der Substratumsetzung allen Chaperonen der HSP70-Familie gemein ist, können bei komplexeren Eukaryoten wie *Homo sapiens* die einzelnen Isoformen unterschiedliche subzelluläre Lokalisationsmuster aufweisen (Tabelle 2.2). Darüber hinaus werden einige Hsp70-Homologe nur von Zellen bestimmter Gewebe oder nur unter besonderen Umständen exprimiert, etwa infolge von Stressexposition.

**Tabelle 2.2: Derzeit gebräuchliche Nomenklatur, ursprüngliche beziehungsweise alternative Bezeichnungen und bislang bekannte Lokalisation der von *Homo sapiens* exprimierten Chaperone der HSP70-Familie.** Nach Daugaard *et al.*, 2007, Brocchieri *et al.*, 2008 und Kampinga *et al.*, 2009; abgewandelt.

Gen	Protein	alternative Namen	Lokalisation / Bemerkungen
<i>hspa1a</i>	HSPA1A	Hsp70-1a, Hsp72, HspA1	Zytosol, Nukleus, Lysosomen; stressinduzierbar;
<i>hspa1b</i>	HSPA1B	Hsp70-1b, Hsp72	Zytosol, Nukleus, Lysosomen; stressinduzierbar;
<i>hspa1l</i>	HSPA1L	Hsp70-1t, Hsp70-hom	Zytosol, Nukleus;
<i>hspa2</i>	HSPA2	Hsp70-3, Hsp70-2	Zytosol, Nukleus;
<i>hspa5</i>	HSPA5	BiP, Grp78, Mif2	Endoplasmatisches Retikulum;
<i>hspa6</i>	HSPA6	Hsp70B, Hsp70-6	Zytosol, Nukleus; stressinduzierbar;
<i>hspa7</i>	HSPA7	Hsp70-1	subzelluläre Lokalisation unbekannt;
<i>hspa8</i>	HSPA8	Hsc70, Hsp73, Hsp70-8	Zytosol, Nukleus;
<i>hspa9</i>	HSPA9	Grp75, mtHsp75, Mortalin	Mitochondrien;
<i>hspa12a</i>	HSPA12A	FLJ13874, KIAA0417	subzelluläre Lokalisation unbekannt;
<i>hspa12b</i>	HSPA12B	RP23-32L15.1	subzelluläre Lokalisation unbekannt;
<i>hspa13</i>	HSPA13	Stch	Mikrosomen;
<i>hspa14</i>	HSPA14	Hsp70-4, Hsp70L1	subzelluläre Lokalisation unbekannt;

Eine signifikante Expression von HSPA1L ist bislang nur für die Testikel beschrieben, in anderen Geweben wird dieses Hsp70-Chaperon kaum synthetisiert (Daugaard *et al.*, 2007; Kampinga *et al.*, 2009). Ähnliches gilt für HSPA2, welches in vielen Geweben auf geringem, in Testikeln und Gehirn aber auf hohem Niveau konstitutiv exprimiert wird. Eine Deletion von *hspa2* führt bei *Mus musculus* aufgrund massiver Apoptose von Keimzellen zu Sterilität der männlichen Tiere. Das Vorhandensein von HSPA5 ist grundsätzlich auf das Endoplasmatische Retikulum beschränkt, auch HSPA5 wird konstitutiv exprimiert. Da aus einer Deletion von *hspa5* im Falle von *Mus musculus* eine letale Störung der Embryogenese resultiert, wird dieses Gen als essentiell eingestuft. HSPA6 wird nach derzeitigem Sachstand nur von einigen spezialisierten Zelltypen wie etwa Monozyten, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen konstitutiv exprimiert. Von anderen Zelltypen wird HSPA6 nur als Reaktion auf Stressfaktoren hoher Intensität synthetisiert. Ähnliches könnte



auch für das Genprodukt von *hspa7* gelten. Letzteres wurde ursprünglich als Pseudogen eingestuft, ist aber wahrscheinlich tatsächlich exprimierbar und weist eine *hspa6* sehr ähnliche Nukleotidsequenz auf (Leung *et al.*, 1992; Brocchieri *et al.*, 2008).

Bei HSPA8 (nach der englischen Bezeichnung "*Heat Shock Cognate 71 kDa Protein*" nachfolgend "Hsc70" genannt) handelt es sich um das allgemeine "Haushalts-Hsp70" eukaryotischer Zellen. Hsc70 ist unter anderem an essentiellen Prozessen wie der parallel zur Translation erfolgenden Faltung von Proteinen sowie der Translokation von Proteinen über intrazelluläre Membranen beteiligt. Eine Deletion von *hspa8* ist bei *Mus musculus* nicht möglich. Demgegenüber wird HSPA9 als mitochondriales "Haushalts-Hsp70" betrachtet, da es eine entsprechende Zielsequenz aufweist und innerhalb der Mitochondrien etwa an der parallel zum Import erfolgenden Faltung anderer Proteinen beteiligt ist (Daugaard *et al.*, 2007). Zumindest bei immortalisierten humanen Zellen ist HSPA9 jedoch auch im Endoplasmatischen Retikulum und im Zytoplasma vorhanden (Ran *et al.*, 2000).

HSPA12A, HSPA12B, HSPA13 und HSPA14 sind bislang nur oberflächlich charakterisiert. Von HSPA13 wird angenommen, dass es sich um ein für Mikrosomen spezifisches Hsp70 handeln könnte (Kampinga *et al.*, 2009). Von HSPA12A, HSPA12B und HSPA14 ist praktisch nur bekannt, dass diese von humanen Zellen exprimiert werden können und von einigen Tumorzelltypen verstärkt synthetisiert werden (Yang *et al.*, 2015).

### **2.3 Die stressinduzierbaren Hsp70-Chaperone HSPA1A und HSPA1B**

Die bestuntersuchten humanen Vertreter der HSP70-Familie sind die stressinduzierbaren Isoformen HSPA1A und HSPA1B. Die für diese beiden Chaperone kodierenden Gene sind in einem Abstand von etwa 11.000 Basenpaaren auf dem kurzen Arm von Chromosom sechs lokalisiert und enthalten keine Introns (Wu *et al.*, 1985; Milner und Campbell, 1990). Die Nukleotidsequenzen von *hspa1a* und *hspa1b* unterscheiden sich nur sehr geringfügig. Daher sind die Genprodukte mit Ausnahme von zwei Aminosäuren identisch und werden als funktionell redundant betrachtet (Kampinga *et al.*, 2009). Eine Deletion beider Gene führt bei *Mus musculus* lediglich zu einer allgemein verminderten Stresstoleranz, die Tiere sind jedoch überlebensfähig und fertil (Daugaard *et al.*, 2007).

Die Promotor-Regionen von *hspa1a* und *hspa1b* enthalten sowohl Bindestellen für allgemeine Transkriptionsfaktoren, als auch sogenannte Hitzeschockelemente (Wu *et al.*, 1986; Greene *et al.*, 1987; Williams und Morimoto, 1990). Letztere ermöglichen die Regulation der stressinduzierten Expression durch Hitzeschockfaktoren (HSFs). Daher können *hspa1a* und *hspa1b* grundsätzlich sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch stressindu-

ziert exprimiert werden. Darüber hinaus weisen nicht nur die Promotor-Regionen von *hspa1a* und *hspa1b*, sondern auch die untranslatierten Bereiche der jeweiligen Boten-Ribonukleinsäuren (in Anlehnung an die englischen Bezeichnung "*Messenger Ribonucleic Acid*" nachfolgend mit "mRNS" abgekürzt) einige Unterschiede auf (Smith *et al.*, 2007). Dementsprechend sind nicht nur eine parallele beziehungsweise gleichzeitige, sondern auch eine differentielle Expression von *hspa1a* und *hspa1b* möglich.

### 2.3.1 Expression von Hsp70 bei gesunden humanen und murinen Zellen

Eine Expression von HSPA1A und HSPA1B (nachfolgend, sofern nicht explizit anders beschrieben, zusammenfassend als "Hsp70" bezeichnet) unter physiologischen Bedingungen ist bislang nur für bestimmten Gewebe oder einzelne Zelltypen beschrieben (Sciegliniska *et al.*, 2011). So konnte bei pathologisch unauffälligen humanen Geweben eine konstitutive Expression von Hsp70 beispielsweise bei Proben von Niere, Nebenniere, Harnblase, Prostata, Brust, Bronchien, Herz, Oesophagus und Haut nachgewiesen werden, welche zum Teil auf bestimmte Zelltypen beschränkt war. Bei entsprechenden Proben von Groß- und Kleinhirn, Magen, Leber, Milz, Lymphknoten, Schilddrüse, Testikeln, Dick- und Dünndarm sowie Skelettmuskulatur war Hsp70 hingegen nicht nachweisbar. Darüber hinaus wurde am Beispiel diverser humaner Zelllinien und unter Verwendung von *Mus musculus* als Modellorganismus eine verstärkte Expression von Hsp70 nicht nur in der unmittelbar auf die Zellteilung erfolgenden Wachstums- (G1-) Periode, sondern auch in der Synthese- (S-) Phase des Zellzyklus demonstriert (Imperiale *et al.*, 1984; Wu und Morimoto, 1985; Milarski und Morimoto, 1986; Taira *et al.*, 1997). Daher wird davon ausgegangen, dass die Expression von Hsp70 unter physiologischen Bedingungen auf bestimmte Zelltypen beziehungsweise Phasen des Zellzyklus beschränkt ist (Daugaard *et al.*, 2007). Auch im Falle der subzellulären Lokalisationsmuster von Hsp70 wird eine vom Zelltyp abhängige Verteilung vermutet. So wurde beispielsweise anhand von Gewebeproben demonstriert, dass Hsp70 innerhalb epithelialer Zellen von Haut, Bronchien und Oesophagus überwiegend gleichmäßige verteilt ist (Sciegliniska *et al.*, 2011). Bei Zellen von Nebenniere, Harnblase und Prostata hingegen akkumuliert Hsp70 innerhalb der Zellkerne.

Im Gegensatz zur basalen wird die stressinduzierte Steigerung der Hsp70-Expression als integraler Bestandteil der Stressantwort humaner Zellen betrachtet (Lindquist, 1986; Lindquist und Craig, 1988; Multhoff, 2007; Zorzi und Bonvini, 2011). Diese wird im Allgemeinen durch oxidativen Stress initiiert, weshalb die ursächlichen Stressfaktoren vielfältig sein können. So erfolgt eine Induzierung oder Steigerung der Synthese von Hsp70 nicht

nur als Reaktion auf Temperaturschwankungen, sondern auch infolge von Schwermetall-, Strahlungs-, Chemikalien- oder Pharmazeutika-Exposition (Lindquist und Craig, 1988; Gehrmann *et al.*, 2002; Gehrmann *et al.*, 2004; Calderwood *et al.*, 2006). Letzteres konnte im Falle von thermischem und osmotischem Stress etwa bei primären humanen Keratinozyten demonstriert werden (Garmyn *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurde bei Leukozyten gesunder humaner Probanden eine vom Zelltyp abhängige Intensivierung der Hsp70-Expression infolge einer Ganzkörperhyperthermie-Behandlung gezeigt (Oehler *et al.*, 2001). Demgegenüber wurde bei Primärkulturen muriner Nervenzellen beobachtet, dass Motoneurone im Gegensatz zu Gliazellen trotz Exposition gegenüber thermischem Stress keine Hsp70-Stressantwort initiierten (Brown und Rush, 1999; Batulan *et al.*, 2003). Daher wird davon ausgegangen, dass sowohl die Fähigkeit zur stressinduzierten Steigerung der Expression, als auch die Intensität der Hsp70-Stressantwort vom Zelltyp abhängig sind.

### **2.3.2 Expressionsmuster von Hsp70 bei humanen Tumorzellen**

Im Gegensatz zu gesunden humanen Zellen weisen nicht nur Tumorzellen, sondern auch von Viren befallene Zellen grundsätzlich bereits unter physiologischen Bedingungen eine erhöhte Expression von Hsp70 auf (DeNagel und Pierce, 1992, 1992; Ciocca und Calderwood, 2005; Calderwood *et al.*, 2006). Im Falle der Tumorzellen resultiert dies einerseits aus dem Umstand, dass diese aufgrund ihres unkontrollierten Wachstums ständig mit externen Stressfaktoren wie Hypoxie, Azidose, Nährstoff- oder Metabolitenmangel konfrontiert sind (Taddei *et al.*, 2013). Des Weiteren müssen entdifferenzierte Tumorzellen und virusinfizierte Zellen interne Stressfaktoren ausgleichen. Hierzu zählen neben deregulierte Signalwege auch mutations- beziehungsweise infektionsbedingt akkumulierende fehlgefaltete respektive virale Proteine (Jindal und Young, 1992; Luo *et al.*, 2009). Darüber hinaus kann Hsp70 mit Apoptose-relevanten Signalkaskaden interferieren.

Durch Hsp70 können sowohl intrinsisch initiierte als auch extrinsisch induzierte Apoptosewege blockiert werden (Murphy, 2013). Beispielsweise interagiert Hsp70 mit Regulatorproteinen der B-Zell-Lymphom-Zwei-Familie oder mit Rezeptoren der Todesrezeptor-Familie (gemäß der englischen Bezeichnungen "*B-Cell Lymphoma Two*" sowie "*Death Receptor*" nachfolgend mit "Bcl-2" beziehungsweise "DR" abgekürzt). Im Falle der Bindung des proapoptotischen Bcl-2-assoziierten Proteins X (BAX) wird dessen Translokation in die Mitochondrien verhindert und dadurch etwa die durch BAX induzierte Freisetzung von Zytocromen des C-Typs unterbunden. Durch Bindung bestimmter DRs hingegen wird die Assemblierung von Zelltod-induzierenden Signalkomplexen blockiert.

Allgemein wird Hsp70 eine besondere Bedeutung für die Homöostase von Tumorzellen zugeschrieben, zumal eine dauerhafte Reduzierung des basalen Expressionsniveaus bei vielen Tumorzelllinien letal wirkt. Letzteres wurde etwa am Beispiel der permanenten Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB468, SKBR3, BT549 und MCF7 demonstriert (Nylandsted *et al.*, 2000). Bei diesen bewirkte bereits eine unvollständige Depletion von Hsp70 mittels transfizierter Antisense-Ribonukleinsäuren eine Reduzierung der Zellviabilität um bis zu 60 %. Eine dauerhafte Depletion hingegen, realisiert etwa mittels adenoviraler Expressionssysteme, reduzierte die Zellviabilität innerhalb weniger Tage um 70 bis 100 %. Ähnliches wurde bei permanenten und primären Mundhöhlen-Plattenepithelkarzinom-Zelllinien beobachtet (Kaur und Ralhan, 2000; Nylandsted *et al.*, 2000). Auch bei diesen führte die Depletion von Hsp70 mittels Ribonukleinsäure-Interferenz zur Reduzierung von Zellviabilität und Zellproliferation. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass letztgenannte Auswirkungen vor allem Zellen in der S-Phase des Zellzyklus betreffen.

Interessanterweise kann eine erzwungene Steigerung der Expression von Hsp70 ebenfalls negative Effekte nach sich ziehen. Letzteres wurde etwa anhand von immortalisierten Jurkat-T-Zellen demonstriert, die Hsp70 aufgrund einer stabilen Transfektion mit Vektoren, welche die entsprechenden Gene enthielten, konstitutiv überexprimierten (Liossis *et al.*, 1997). Diese Zellen zeigten zwar eine erhöhte Stresstoleranz gegenüber thermischem Stress, waren zugleich aber anfälliger für durch T-Zell-Antigen-Rezeptoren vermittelte oder durch Tumornekrosefaktor-Rezeptoren induzierte Apoptose. Ähnliches wurde auch bei HeLa-Zervixkarzinom-Zellen und immortalisierten, ursprünglich gesunden embryonalen Nierenzellen der Zelllinie HEK293 beobachtet (Ran *et al.*, 2004).

HeLa- und HEK293-Zellen reagieren unter physiologischen Bedingungen im Allgemeinen nicht auf Tumornekrosefaktoren (TNFs). Im Falle einer durch stabile Transfektion erzwungenen oder einer durch einen Hitzeschock induzierten Überexpression von Hsp70 lässt sich jedoch bei beiden Zelllinien Apoptose durch Zugabe rekombinanter TNFs induzieren. Dies konnte darauf zurückgeführt werden, dass Hsp70 durch Bindung der Gamma-Untereinheit des I-Kappa-B-Kinase- (IKK-) Komplexes mit der IKK-abhängigen Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors Kappa-B (NF-KB) interferiert. Hierdurch wird einerseits die durch TNFs induzierte Expression antiapoptotischer Proteine reduziert. Andererseits wird aber die TNF-abhängige Aktivierung der apoptotischen Caspase-Signalkaskade nicht wesentlich beeinflusst. Daher können Zellen, die Hsp70 dauerhaft überexprimieren, bei Exposition gegenüber TNFs die durch Caspasen vermittelte Apoptose nicht mehr unterdrücken und starten das "Suizidprogramm".

Ebenso vielfältig wie die Auswirkungen, die durch Interaktionen von Hsp70 mit bestimmten Proteinen ausgelöst werden können, sind die basalen Hsp70-Expressionsniveaus unterschiedlicher Tumorzelltypen ausgeprägt. So exprimieren MCF7-Mammakarzinom-Zellen unter physiologischen Bedingungen nur etwa ein Drittel der Hsp70-Menge, die von HeLa-Zervixkarzinom-Zellen synthetisiert wird (Rohde *et al.*, 2005). Darüber hinaus erfolgt die Transkription der Gene *hsp70a* und *hsp70b* nicht zwangsläufig gleichmäßig. So liegt das basale Transkriptionsniveau von *hsp70a* bei HeLa- und MCF7-Zellen um etwa 330 % über dem von *hsp70b*, während LoVo36-Kolonkarzinom-Zellen die Chaperone praktisch ausschließlich über *hsp70b* transkribieren. Vergleichbares wurde bei 253JBV- und UMUC13-Harnblasenlymphom- sowie SW780- und UMUC10-Harnblasenübergangsepithelkarzinom-Zellen beobachtet (Qi *et al.*, 2013b): Obgleich letztere Tumorzelllinien ähnliche basale Hsp70-Expressionsniveaus aufweisen, transkribieren 253JBV- und SW780-Zellen beide *hsp70*-Gene gleichmäßig, UMUC10- und UMUC-13-Zellen hingegen nur *hsp70b*. Dies konnte darauf zurückgeführt werden, dass die *hsp70a*-Promotoren im Falle der UMUC10- und UMUC-13-Zellen in methylierter Form vorliegen.

Ähnlich wie die basalen können auch die stressinduzierten Hsp70-Expressionsmuster einzelner Tumorzelllinien differieren. Beispielsweise steigern sowohl HeLa-Zervixkarzinom- als auch T98G-Glioblastom-Zellen die Transkription der *hsp70*-Gene infolge eines Hitzeschocks einer Intensität von 42 °C und einer Dauer von 30 Minuten etwa um das Zwanzigfache (Mathur *et al.*, 1994). Y79-Retinoblastom-Zellen hingegen sind unter vergleichbaren Bedingungen nur zu einer siebenfachen Transkriptionssteigerung fähig. Die hierbei zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang nicht im Detail bekannt. Allerdings ergaben sich im Falle der Y79-Zellen zumindest Hinweise darauf, dass bei diesen die Hitzeschockelemente innerhalb der Promotor-Regionen der *hsp70*-Gene für den Hitzeschock-Transkriptionsfaktor HSF1 blockiert sind (Mathur *et al.*, 1994). Für andere Transkriptionsfaktoren könnten diese jedoch zugänglich sein. Darüber hinaus wurde am Beispiel von HeLa- und HEK293-Zellen gezeigt, dass bei diesen die Intensität der Hsp70-Expression von der Stabilität der entsprechenden mRNAs abhängt (Theodorakis und Morimoto, 1987). So wurden bei ungestressten Zellen dieser Zelllinien Halbwertszeiten der jeweiligen *hsp70*-mRNAs von bis zu 50 Minuten festgestellt, nach einem Hitzeschock aber von mehreren Stunden (Theodorakis und Morimoto, 1987).

Derzeit wird vermutet, dass die Intensität der basalen Hsp70-Expression Tumorzelltypspezifisch sein könnte. Allerdings zeigten bislang verfügbare klinische Studien bezüglich basaler Expression und Behandlungsprognose insbesondere bei malignen Tumoren keinen

einheitlichen Zusammenhang (Ciocca und Calderwood, 2005; Calderwood *et al.*, 2006; Qi *et al.*, 2013a). Jedoch mehren sich die Hinweise, dass für eine belastbare Behandlungsprognose die Betrachtung basaler oder stressinduzierter Hsp70-Expressionsniveaus allein nicht ausreichend ist. Vielmehr scheinen - abgesehen von der entsprechenden Therapieform - auch die jeweiligen extra- und subzellulären Lokalisationsmuster der Chaperone bedeutsame Faktoren zu sein (Ramp *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2012a; Nadin *et al.*, 2014).

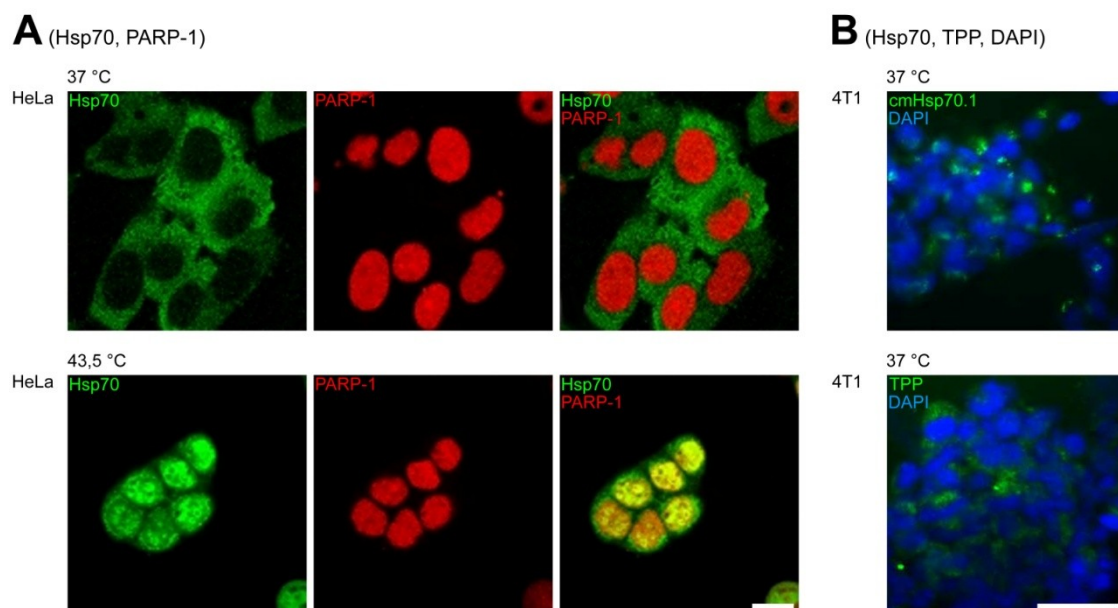
### **2.3.3 Subzelluläre Lokalisation von Hsp70 bei humanen Tumorzellen**

Analog zu gesunden Zellen können bei Tumorzellen im Falle von Hsp70 drei wesentliche subzelluläre Lokalisationsmuster unterschieden werden: Die Chaperone können größtenteils zytosolisch lokalisiert, überwiegend im Zellkern enthalten oder innerhalb der Zellen weitgehend gleichmäßig verteilt sein. So ist Hsp70 beispielsweise innerhalb von MCF7-Zellen unter physiologischen Bedingungen nahezu gleichmäßig verteilt (Barnes *et al.*, 2001). Bei diesen Zellen ist der Anteil des zytosolischen Hsp70 nur geringfügig höher, als jener der nukleär lokalisierten Chaperone. Bei ungestressten HeLa-Zellen ist Hsp70 hingegen praktisch ausschließlich zytosolisch lokalisiert (Kotoglou *et al.*, 2009).

Interessanterweise können die subzellulären Lokalisationsmuster von Hsp70 auch zwischen ungestressten und gestressten Tumorzellen variieren. So wurde etwa am Beispiel von HeLa-Zellen demonstriert, dass die Chaperone nach Stressexposition in den Zellkernen und innerhalb derselben in den Nukleoli akkumulieren (Zeng *et al.*, 2004; Kotoglou *et al.*, 2009). Bei HeLa-Zellen ändert sich die Distribution von Hsp70 stressinduziert so extrem, dass etwa 90 Minuten nach einem Hitzeschock einer Intensität von 43,5 °C und einer Dauer von gleichfalls 90 Minuten der überwiegende Anteil der Chaperone nicht mehr im Zytosol, sondern in den Zellkernen enthalten ist (Abbildung 2.5 A).

Der Letzterem zugrundeliegende Translokalisationsmechanismus ist noch nicht im Detail bekannt. Jedoch konnte festgestellt werden, dass die Akkumulation von Hsp70 in Zellkernen sowohl durch einen verstärkten Import, als auch durch eine Reduzierung des Exports der Chaperone bewerkstelligt wird (Zeng *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der nukleäre Import von Chaperonen der HSP70-Familie im Allgemeinen nicht von den regulären Importin-Transportproteinen abhängig ist (Imamoto und Kose, 2012). Vielmehr wird unter Stressbedingungen eine Bindung von Hsp70-Proteinen an Transporter des Hikeschi-Typs etwa durch Ko-Chaperonen der HSP110-Familie induziert. Die Hikeschi-Transporter vermitteln dann die Translokation durch die Kernporenkomplexe. Innerhalb wie außerhalb der Zellkerne erfüllen die stressinduzierbaren Vertreter der HSP70-Familie

ihre Hauptaufgaben im Zusammenwirken mit weiteren Chaperonen und Ko-Chaperonen. Diese bestehen im Wesentlichen darin, unter Stressbedingungen andere Proteine vor Fehlfaltungen zu schützen, deren Aggregation zu unterbinden und bereits vorhandene Proteinaggregate aufzulösen (Mosser und Morimoto, 2004; Nillegoda *et al.*, 2015). Darüber hinaus interagiert Hsp70 innerhalb der Zellkerne mit verschiedenen Desoxyribonukleinsäure- (DNS-) Reparaturenzymen (Kotoglou *et al.*, 2009). Somit sind die Chaperone direkt oder indirekt an Mechanismen beteiligt, die dem Schutz oder der Wiederherstellung der Integrität karyoplasmatischer oder ribosomaler Nukleinsäuren dienen.



**Abbildung 2.5: Lokalisation von Hsp70 bei humanen HeLa-Zervixkarzinom- und murinen 4T1-Mammakarzinom-Zellen.** (A) Subzelluläre Lokalisation von Hsp70 bei ungestressten (37 °C) und gestressten (43,5 °C, 90 Minuten, 90 Minuten Erholungszeit bei 37 °C) HeLa-Zellen. Hsp70 (grün) sowie das in die Reparatur von Nukleinsäuren involvierte Enzym Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Eins (PARP-1; rot) wurden nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen indirekt immunfluoreszenzmarkiert. Maßstab: 10 µm. Nach Kotoglou *et al.*, 2009; abgewandelt. (B) Lokalisation des auf den extraplasmatrischen Seiten den Plasmamembranen exponierten Hsp70 bei ungestressten (37 °C) 4T1-Zellen. Hierbei wurde Hsp70 mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper oder Peptide markiert. Der genutzte monoklonale Antikörper (cmHsp70.1; grün) ist für Hsp70 in Form integraler Membranproteine spezifisch. Das Peptid (gemäß der von den Autoren verwendeten englischen Bezeichnung "Tumor Cell-penetrating Peptide-based Probe" mit "TPP" abgekürzt; grün) interagiert mit dem Bereich des Linkers, der für die Dimerisierung der Chaperone essentiell ist. Vermutlich wurden die Zellen zunächst mit Antikörpern beziehungsweise Peptiden behandelt, im Anschluss fixiert und nach Markierung der Desoxyribonukleinsäuren mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blau) analysiert. Zum Maßstab wurden keine Angaben gemacht. Nach Gehrmann *et al.*, 2014; abgewandelt.

Bemerkenswert bei Chaperonen der HSP70-Familie ist weiterhin, dass es sich bei diesen nicht zwangsläufig um soluble Proteine handelt. So wurde bei murinen und humanen, gesunden wie auch Tumorzellen sowie bei von diesen abstammenden Zelllinien beobachtet, dass diverse Vertreter der HSP70-Familie eine gewisse Tendenz zur Assoziation mit unterschiedlichen Biomembranen zeigen (Alder *et al.*, 1990; Multhoff *et al.*, 1995; Kurucz *et*

*al.*, 1999; Broquet *et al.*, 2003). Ein Grund hierfür ist die Tatsache, dass diese Chaperone zur direkten Interaktion mit Lipiden fähig sind (Mamelak *et al.*, 2001). Der zugrundeliegende Mechanismus ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung, jedoch konnten bereits einige Schlüsselkomponenten identifiziert werden. So wurden etwa mittels unilamellarer Liposomen demonstriert, dass für Intensität und Ausprägung der Interaktion die Lipidkomposition der Liposomen eine wesentliche Rolle spielt. Gemeinhin werden von Hsp70-Chaperonen negativ geladene Phospholipide wie etwa Cardiolipin, Bismonoacylglycerophosphat und Phosphatidylserin (PS) als Interaktionspartner bevorzugt (Armijo *et al.*, 2014; Mahalka *et al.*, 2014). Auch wird davon ausgegangen, dass nicht nur die NBD, sondern auch die SBD in die Hsp70-Lipid-Interaktionen involviert sind.

Interessanterweise kann es infolge der Interaktion von Hsp70-Chaperonen mit Membranen zu einem Übergang von peripherem zu integralem Hsp70 kommen. Letzteres wurde etwa anhand von PS-Liposomen und rekombinantem Hsp70 demonstriert (Armijo *et al.*, 2014, 2014). Hierbei erwies sich die NBD von Hsp70 als in die Membranen inseriert, die SBD aber als teilweise auf den extraluminalen Seiten der Liposomen exponiert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass integrale Hsp70-Moleküle oligomerisieren und Ionenkanäle bilden können (Vega *et al.*, 2008). Allerdings wurde etwa im Falle von Cardiolipin-Liposomen eine Verminderung der Hsp70-Lipid-Interaktionen in Anwesenheit von Nukleotiden beobachtet (McCallister *et al.*, 2015). Daher wird angenommen, dass die Interaktion beziehungsweise die Insertion nicht nur von der Konformation der Chaperone, sondern auch von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der jeweiligen Interaktionspartner beeinflusst wird. Unklar ist indes, ob es sich bei der Insertion von Hsp70 in Membranen um einen generellen Mechanismus handelt. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die Chaperone der HSP70-Familie grundsätzlich sowohl als periphere als auch in Form integraler Membranproteine vorliegen können (Armijo *et al.*, 2014; Mahalka *et al.*, 2014).

### **2.3.4 Extrazelluläres Hsp70 bei humanen Tumorzellen**

Derzeit wird dem integralen Hsp70 besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Dies ist einerseits darauf zurückzuführen, dass Hsp70 in Form integraler Plasmamembranproteine für Tumorzellen spezifisch zu sein scheint (Multhoff *et al.*, 1995; Multhoff und Hightower, 2011). Letzteres wurde nicht nur am Beispiel von Zelllinien demonstriert (vergleiche Abbildung 2.5 B), sondern auch anhand von Biopsie-Proben verschiedenster humaner Tumore und korrespondierender gesunder Gewebe bestätigt (Hantschel *et al.*, 2000; Multhoff, 2007). Hierbei konnte integrales Hsp70 nur auf den Oberflächen von Tumorzellen, nicht



jedoch auf den Plasmamembranen von gesunden Zellen nachgewiesen werden. Hsp70 ist bei Tumorzellen jedoch nicht nur auf den extraplasmatischen Plasmamembranseiten exponiert, sondern kann von diesen auch in freier Form sekretiert werden. Die Externalisierung von solublen Hsp70 erfolgt durch bislang nur ansatzweise charakterisierte, unkonventionelle Sekretionswege. So wird vermutet, dass Hsp70 durch ABC-Transporter in endolysosomale Kompartimente überführt und mittels sekretorischer Lysosomen externalisiert werden könnte (Mambula und Calderwood, 2006). Auch eine parallele transversale Diffusion von integrelem Hsp70 und PS von der zytosolischen auf die extraplasmatische Seite der Plasmamembran wird für möglich erachtet (Vega *et al.*, 2008).

Neben der direkten Freisetzung von solublen Hsp70 können Tumorzellen die Chaperone auch in oder auf extrazellulären Vesikeln (EVs) indirekt externalisieren, wobei sich zwei Grundtypen von EVs unterscheiden lassen (de Maio, 2011; Lee *et al.*, 2011; Di Vizio *et al.*, 2012; Raposo und Stoorvogel, 2013). Einerseits können durch Verschmelzung multivesikulärer, später Endosomen mit der Plasmamembran sogenannte Exosomen sekretiert werden. Diese erreichen Durchmesser von bis zu 100 Nanometern (in Anlehnung an die englische Bezeichnung "*Tumor-derived Microvesicles*" nachfolgend "TMVs" genannt). Andererseits können Tumorzellen durch Abschnürung von Bereichen der Plasmamembran EVs mit Durchmessern zwischen einem und zehn Mikrometern freisetzen. Diese werden unter anderem als Ektosomen, Membranpartikel oder Gigantvesikel bezeichnet (gemäß der englischen Bezeichnung "*Shedding Vesicles*" nachfolgend mit "SVs" abgekürzt).

Exosomen beziehungsweise TMVs werden vermutlich von allen Zellen respektive Tumorzellen sekretiert. Diese können neben diversen Proteinen auch unterschiedliche Typen von Ribonukleinsäuren (RNS) sowie einzel- oder doppelsträngige DNS enthalten (Minciacchi *et al.*, 2015a). Ebenso vielfältig wie die biochemischen Kompositionen sind die möglichen Funktionen dieser kleinen EVs. So wurde die Sekretion von Exosomen beispielsweise mit intrazellulärer Kommunikation, dem Materialaustausch zwischen Zellen, dem Export überflüssiger Proteine oder der Präsentation von Antigenen in Verbindung gebracht (Beach *et al.*, 2014). Im Falle der von Tumorzellen sekretierten TMVs kann Hsp70 nicht nur im Lumen derselben, sondern auch in deren Membranen enthalten sein (Gastpar *et al.*, 2005).

Im Gegensatz zur Sekretion von Exosomen beziehungsweise TMVs ist derzeit noch unklar, ob es sich bei der Abschnürung von SVs um ein generelles Phänomen handelt, oder ob nur bestimmte Typen von gesunden sowie von Tumorzellen hierzu in der Lage sind. Gemeinhin wird die Bildung großer SVs mit Durchmessern von bis zu zehn Mikrometern als besonderes Merkmal amöboider Tumorzellen betrachtet (Di Vizio *et al.*, 2012). Die

Abschnürung solcher großen SVs wurde beispielsweise bei 252J-Harnblasenkarzinom-, LNCAP-Prostatakarzinom- sowie U87-Glioblastom-Zellen und bei auf Metastasen von Prostata-Tumoren zurückzuführenden Zelllinien wie etwa PC3 und DU145 beobachtet. Deren als große Onkosomen bezeichnete SVs enthalten neben RNA, DNA und Metalloproteinasen insbesondere Proteine, die in Signaltransduktion, RNA-Prozessierung, Metabolismus, Wachstum und Motilität involviert sind (Di Vizio *et al.*, 2009). Darüber hinaus wurde demonstriert, dass große Onkosomen gegenüber Gelatine proteolytische Aktivität entfalten und die Migration invasiver Tumorzellen erleichtern können (Di Vizio *et al.*, 2012). Unter Berücksichtigung von an *Mus musculus* gewonnen Erkenntnissen wurde daher ein Funktionsmodell etabliert, welches mögliche Auswirkungen der Abschnürung dieser großen SVs beschreibt. Demselben entsprechend wird durch die Freisetzung von Onkosomen eine Auflösung von Elementen der extrazellulären Matrix sowie eine Auflockerung endothelialer Zell-Zell-Verbindungen induziert. Hierdurch wird einerseits der Übergang invasiver Tumorzellen in Gefäße erleichtert. Andererseits wird aber auch der umgekehrte Weg ermöglicht und dadurch die Metastasierung gefördert (Di Vizio *et al.*, 2012).

Interessanterweise können sowohl freies als auch vesikuläres Hsp70 Effekte auslösen, die sich negativ auf Proliferation und Viabilität von Tumorzellen auswirken können (de Maio, 2011). So wurde beispielsweise mittels rekombinantem Hsp70 und der aus CX2-Kolonadenokarzinom-Zellen generierten Subzelllinien CX- demonstriert, dass die solublen Chaperone auf den Zelloberflächen mit PS interagieren können (Schilling *et al.*, 2009). Darüber hinaus wurden hierbei eine von der Hsp70-Konzentration abhängige Reduzierung der Zellviabilität sowie eine Steigerung der Radiosensitivität festgestellt.

Abgesehen von letztgenannten Auswirkungen können extrazelluläre soluble Chaperone der HSP70-Familie auch immunstimulatorische Effekte induzieren (Juhasz *et al.*, 2013). Letzteres konnte unter anderem anhand von aus humanen Tumorzellen extrahierten Komplexen von Hsp70 oder Hsc70 und Peptiden sowohl an Zellkultur- als auch an Mausmodellen demonstriert werden (Udono und Srivastava, 1993; Noessner *et al.*, 2002). Weiterhin wurde festgestellt, dass Hsp70-Peptid-Komplexe durch professionelle antigenpräsentierende Zellen über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und prozessiert werden (Arnold-Schild *et al.*, 1999). Die resultierenden antigenen Peptide werden dann auf Haupthistokompatibilitätskomplexen der Klasse I kreuzpräsentiert, was eine adaptive, tumorspezifische Immunreaktion zytotoxischer T-Zellen induziert (Schild *et al.*, 1999).

Auch TMV-abhängig exportiertes Hsp70 kann Reaktionen zellulärer Komponenten des Immunsystems auslösen. Beispielsweise lassen sich Makrophagen durch Inkubation mit

TMVs, deren Membranen integrales Hsp70 enthalten, zur Sekretion von TNF- $\alpha$  anregen (Vega *et al.*, 2008). Natürliche Killerzellen hingegen reagieren auf derartige TMVs mit einer verstärkten migratorischen und einer gesteigerten zytolytischen Aktivität gegenüber den Tumorzellen, welche die TMVs ursprünglich freisetzen (Gastpar *et al.*, 2005). Allerdings können durch TMVs nicht nur immunstimulatorische Effekte induziert, sondern auch immunsuppressive Reaktionen ausgelöst werden (Zhang und Grizzle, 2011). Beispielsweise werden von bestimmten Tumorzelltypen TMVs freigesetzt, auf deren Oberflächen Proteine wie etwa Fas-Liganden (FasL) oder mit Tumornekrosefaktoren verwandte und Apoptose induzierende Liganden (TRAIL) vorhanden sind. Unter anderem am Beispiel von TMVs sowie von T-Zellen, die aus Blutproben von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen isoliert worden waren, konnte demonstriert werden, dass derartige TMVs bei aktivierten T-Zellen Apoptose induzieren können (Kim *et al.*, 2005).

Demgegenüber ist nach aktuellem Sachstand nicht bekannt, ob auch SVs immunmodulatorische Wirkungen entfalten können. Ebenso ist unklar, welche allgemeine funktionelle Relevanz peripherem Hsp70 zukommen könnte. Darüber hinaus wurden SVs wie die großen Onkosomen bezüglich ihres Gehalts von peripherem beziehungsweise integralem Hsp70 bislang nicht charakterisiert. Zumindest von peripherem Hsp70 wird aber angenommen, dass dieses in den Membranen von SVs enthalten sein könnte (Vega *et al.*, 2008).

## 2.4 Problemstellung und Zielsetzung des Dissertationsprojekts

Die meisten gesunden Zellen exprimieren *hspa1a* und *hspa1b* nur unter bestimmten Bedingungen und auf niedrigem Niveau. Die Promotor-Regionen beider Gene sowie die untranslatierten Bereiche der jeweiligen mRNA weisen Unterschiede auf, die Aminosäuresequenzen der Genprodukte hingegen sind nahezu identisch. Daher werden die Chaperone HSPA1A und HSPA1B als funktionell redundant betrachtet. Viele Tumorzellen sind auf eine ständige, im Vergleich zu korrespondierenden gesunden Zellen erhöhte, basale Expression von HSPA1A und HSPA1B beziehungsweise von Hsp70 angewiesen. Auf eine Exposition gegenüber externen Stressfaktoren wie etwa Hitze oder Chemotherapeutika reagieren diese Zellen gemeinhin mit einer Induzierung beziehungsweise Steigerung der Hsp70-Expression. Eine erhöhte basale oder stressinduzierte Expression kann jedoch nicht nur zytoprotektive, sondern auch zytotoxische Effekte nach sich ziehen. Diesbezügliche Studien beschränkten sich bislang zumeist auf einzelne Zelllinien oder erfolgten vielfach nur auf Ebene der mRNA. Daher sollten die basalen sowie die durch thermischen Stress induzierten Hsp70-Expressionsmuster mehrerer Tumorzelllinien unterschiedlicher Her-

kunft biochemisch und auf Proteinebene charakterisiert werden. Die betreffenden Analysen sollten dementsprechend mittels Proteinextraktion, differentieller Zentrifugation, Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot erfolgen.

Abhängig vom betrachteten Zelltyp kann Hsp70 innerhalb von Zellen überwiegend zytosolisch lokalisiert, größtenteils in den Zellkernen enthalten oder aber eher gleichmäßig verteilt sein. Auf den extraplasmatischen Seiten der Plasmamembranen kann Hsp70 sowohl als peripheres, wie auch als integrales Membranprotein vorliegen. Die integrale Form wird als besonderes Merkmal von Tumorzellen betrachtet und fungiert unter anderem als Erkennungsstruktur für natürliche Killerzellen. Stressinduziert wird das zytosolische Hsp70 gemeinhin verstärkt in die Zellkerne transloziert und akkumuliert dort innerhalb der Nukleoli. Die Konzentration des integralen Hsp70 auf den Zelloberflächen steigt nach Stressexposition für gewöhnlich an. Darüber hinaus kommt es unter Stressbedingungen zu einem verstärkten Export von integralem Hsp70 mittels extrazellulärer Vesikel sowie von freiem Hsp70 über unkonventionelle Sekretionswege. Hierbei ist unklar, inwieweit es sich um generelle Phänomene handelt, da sich die betreffenden Studien auf einige wenige Tumorzelllinien oder Subzelllinien beschränkten. Um letzteren Sachverhalt zu prüfen, sollten im Anschluss an die biochemische Charakterisierung der Hsp70-Expressionsmuster auch die subzellulären Hsp70-Lokalisationsmuster unterschiedlicher Tumorzelllinien analysiert werden. Die Analysen sollten mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgen und es ermöglichen, gegebenenfalls auf den extraplasmatischen Plasmamembranseiten vorhandenes peripheres beziehungsweise integrales Hsp70 zu detektieren.

Grundsätzlich können Chaperone der HSP70-Familie auch ohne ATP und Ko-Chaperone mit Substraten interagieren. Letztere Komponenten sind lediglich für einen optimalen Ablauf des Chaperon-Zyklus erforderlich. Bislang ist unbekannt, ob das auf den Oberflächen von Tumorzellen exponierte Hsp70 in der Lage ist, mit Substraten zu interagieren. Daher sollte mittels Fluorochrom-gekoppelter Substratpeptide und entsprechender Detektionsmethoden geprüft werden, ob das exponierte Hsp70 Substrate binden kann.

Primäres Ziel des Projektes sollte es sein, durch vergleichende Analysen verschiedenartiger Tumorzelllinien Unterschiede und Gemeinsamkeiten zu identifizieren, die sich gegebenenfalls als Ansatzpunkte für Tumorthherapie und Tumordiagnostik eignen könnten.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Geräte, Chemikalien, Reagenzien, Verbrauchsmaterial, Software

Die genutzten Geräte sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Zellkulturmedien und Medienzusätze, Chemikalien, Reagenzien sowie Materialien wie Reaktions- und Kulturgefäße sind in Tabelle 3.2 enthalten. Sämtliche Chemikalien wurden, wenn nicht explizit anders beschrieben, im Höchsten vom Hersteller zum Zeitpunkt der Beschaffung angebotenen Reinheitsgrad bezogen. Primärantikörper sowie Enzym- oder Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper und Peptide sind in Tabelle 3.3 aufgeführt, ebenso Artikelnummern, Antikörper-Spezies, Klonalitäten und für Westernblot (WB) sowie Fluoreszenzmikroskopie (FM) erforderliche Verdünnungen beziehungsweise Konzentrationen.

**Tabelle 3.1: Geräte und Software.**

Bezeichnung / Bemerkungen	Bezugsquelle / Hersteller
<b>Gelelektrophorese und Westernblot</b>	
<b>EPS 601</b> Netzgerät; programmierbar	GE Healthcare, Little Chalfont, England
<b>PROTEAN II XL</b> Gelelektrophoreseapparatur; inklusive Gießvorrichtung	Bio-Rad, Hercules, Vereinigte Staaten
<b>Standard-Blotter</b> Transfer Tank	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten
<b>Inkubator</b>	
<b>Heracell 150i</b> CO <sub>2</sub> -Inkubator; befeuchtet	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten
<b>Leitungswasseraufbereitung</b>	
<b>Elix UV</b> Reinstwassersystem; Umkehrosmose, UV-Filter	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Ionenaustauscher</b> Vollentsalzer; Mischbettsystem	verschiedene Anbieter
<b>Ultra Clear</b> Reinstwassersystem; Umkehrosmose, Entionisierung, UV-Oxidation	Siemens, München, Deutschland
<b>Mikroskope und optische Geräte</b>	
<b>Chemilux-Imager</b> digitales Bildgebungssystem; Chemilumineszenz-Detektion	INTAS, Göttingen, Deutschland
<b>DMI6000B</b> Epifluoreszenz-Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
<b>Infinite 200 Pro</b> Mikrotiterplatten-Lesegerät; als Photometer oder Fluorimeter verwendbar	Tecan, Männedorf, Schweiz
<b>TCS SP2</b> konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
<b>Pipetten und Pipettierhilfen</b>	
<b>Acura Manual 855</b> Mehrkanalpipetten; für Volumina bis 50 µL oder bis 200 µl	Socorex, Ecublens, Schweiz
<b>Multipette plus</b> Handdispenser	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

<b>Pipetboy</b> Pipettierhilfe; für Glas- und Plastikpipetten bis 100 mL Volumen	Integra, Biebertal, Deutschland
<b>Pipetman P20G, P200G, P100G</b> Mikropipetten; für Volumina bis 20 µL, 200µL oder 1000 µL	Gilson, Middleton, Vereinigte Staaten
<b>Rotoren</b>	
<b>1619</b> für Tischzentrifuge Rotofix 32 A	Hettich, Beverly, Vereinigte Staaten
<b>24 x 1.5/2.0 ClickSeal Rotor</b> für Tischzentrifugen Heraeus Pico 17 und Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten
<b>TLA 45</b> für Ultrazentrifuge Optima TL	Beckman Coulter, Brea, Vereinigte Staaten
<b>Schüttler</b>	
<b>Duomax 1030</b> Plattformschüttler	Heidolph, Schwabach, Deutschland
<b>Reax 2</b> Überkopfschüttler	Heidolph, Schwabach, Deutschland
<b>Unimax 1010</b> Plattformschüttler	Heidolph, Schwabach, Deutschland
<b>Sicherheitswerkbank</b>	
<b>HeraSafe</b> biologische Sicherheitswerkbank; Belüftung über Schwebstofffilter	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten
<b>Software</b>	
<b>Office 2007 Professional</b> inklusive Word, Excel, PowerPoint	Microsoft, Redmond, Vereinigte Staaten
<b>LabImage 1D</b> Version 4.6	Kapelan, Leipzig, Deutschland
<b>GrapPad Prism</b> Version 5.03	GraphPad, La Jolla, Vereinigte Staaten
<b>Leica Application Suite X</b> Version 3.2.0	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
<b>Illustrator CS2</b> Version 12.0.1	Adobe Systems, San José, Vereinigte Staaten
<b>Photoshop CS5</b> Version 12.0	Adobe Systems, San José, Vereinigte Staaten
<b>Citavi 4</b> Version 4.4	Academic Software, Wädenswil, Schweiz
<b>Sonstige Geräte</b>	
<b>APEX-1502</b> Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
<b>Cellometer Auto T4</b> automatischer Zellzähler	Nexcelom, Lawrence, Vereinigte Staaten
<b>CyberScan PH 510</b> pH-Meter; elektronisch, Glaselektrode	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten
<b>FS 3602</b> Folien-Schweißgerät	Severin, Sundern, Deutschland
<b>IKA MAG RCT</b> Magnetrührer	IKA, Staufen, Deutschland
<b>SI-114</b> Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
<b>Thermomixer Comfort</b> Heizblock	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

<b>Vortex Genie 2</b> Vortexmischer	Bender & Hohbein, Zürich, Schweiz
<b>WOB-L 2511</b> Absaugpumpe	Welch, Niles, Vereinigte Staaten
<b>Yellow Line MSH basic</b> Magnetrührer; beheizbar	IKA, Staufen, Deutschland
<b>Zählkammer</b> Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
<b>Wasserbäder</b>	
<b>GFL 10023</b> Wasserbad; beheizbar	GFL, Burgwedel, Deutschland
<b>Thermomix 18 BU</b> Wasserbad; beheizbar; rezirkulierend	B. Braun, Melsungen, Deutschland
<b>Zentrifugen</b>	
<b>Heraeus Fresco 17</b> Tischzentrifuge; kühlbar	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten
<b>Heraeus Pico 17</b> Tischzentrifuge	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten
<b>Optima TL</b> Ultrazentrifuge; kühlbar	Beckman Coulter, Brea, Vereinigte Staaten
<b>Rotofix 32 A</b> Tischzentrifuge	Hettich, Beverly, Vereinigte Staaten

Tabelle 3.2: Basismedien, Medienzusätze, Chemikalien, Reagenzien und Materialien.

Bezeichnung / Bemerkungen	Bezugsquelle / Hersteller
<b>Basismedien, Medienzusätze und Zellkultur-Lösungen</b>	
<b>Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium</b> 25 mM Glukose, ohne Natriumpyruvat	PAA, Pasching, Österreich
<b>Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium</b> 25 mM Glukose, 1,0 mM Natriumpyruvat	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten
<b>Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium</b> 5,6 mM Glukose, 1,0 mM Natriumpyruvat	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten
<b>Epidermaler Wachstumsfaktor</b> lyophilisiert, Reinheitsgrad 95 %	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten
<b>Fötales Kälberserum</b> hitzeinaktiviert, sterilfiltriert	BioWest, Nuaille, Frankreich
<b>Gentamicin-Lösung</b> 10 mg/mL in 0,9 % Natriumchloridlösung	PAA, Pasching, Österreich
<b>Hams F-12 Medium</b> ohne Phenolrot	PAA, Pasching, Österreich
<b>L-Alanyl-L-Glutamin-Lösung</b> 200 mM in 0,9 % Natriumchloridlösung	PAA, Pasching, Österreich
<b>L-Glutamin-Lösung</b> 200 mM in 0,9 % Natriumchloridlösung	PAA, Pasching, Österreich
<b>Penicillin-Streptomycin-Lösung</b> 10.000 Einheiten/mL, 10 mg/mL in 0,9 % Natriumchloridlösung	PAA, Pasching, Österreich
<b>Trypsin-Ethylendiamintetraacetat-Lösung</b> 0,5 mg/mL, 0,22 mg/mL in Phosphat-gepufferter Salzlösung	PAA, Pasching, Österreich
<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	
<b>2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol</b> Tris; $C_4H_{11}NO_3$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

<b>4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure</b> HEPES; $C_8H_{18}N_2O_4S$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>5(6)-Carboxyfluorescein</b> ungekoppeltes Fluorochrom, Reinheitsgrad $\geq 95\%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten
<b>Acrylamid</b> $C_3H_5NO$ ; Reinheitsgrad 98 %, zweifach kristallisiert	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Ammoniumperoxodisulfat</b> APS; $(NH_4)_2S_2O_8$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Antipain Dihydrochlorid</b> Proteaseinhibitor	Roche, Rotkreuz, Schweiz
<b>Aprotinin</b> Proteaseinhibitor	Roche, Rotkreuz, Schweiz
<b>Bovines Serumalbumin</b> BSA; Reinheitsgrad 98 %, frei von Immunglobulinen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Bromphenolblau</b> $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Cell Mask Deep Red Plasma Membrane Stain</b> Membranfarbstoff	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten
<b>Dimethylsulfoxid</b> DMSO; $C_2H_6OS$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat</b> $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat</b> $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Dithiothreitol</b> DTT; $C_4H_{10}O_2S_2$	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten
<b>Ethanol</b> $C_2H_5OH$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Ethylendiamintetraacetat</b> EDTA; $C_{10}H_{16}N_2O_8$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Fermentas Page Ruler</b> Protein-Größenstandards	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten
<b>Glycerin</b> $C_3H_8O_3$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Glycin</b> $C_2H_5NO_2$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Harnstoff</b> $CH_4N_2O$	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten
<b>Hefeextrakt</b> pulverisiert	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Hoechst 33342</b> $C_{27}H_{31}Cl_3N_6O$	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten
<b>Isopropanol</b> iso- $C_3H_7OH$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Kaliumchlorid</b> KCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Kaliumdihydrogenphosphat</b> $KH_2PO_4$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Laktose</b> $C_{12}H_{22}O_{11}$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Leupeptin Hydrochlorid</b> Proteaseinhibitor	Roche, Rotkreuz, Schweiz
<b>Magnesiumchlorid</b> $MgCl_2$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Methanol</b> $CH_3OH$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland



<b>N-(Tri[hydroxymethyl]methyl)glycin</b> Tricin; $C_6H_{13}NO_5$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin</b> TEMED; $C_6H_{16}N_2$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>N,N'-Methylenbisacrylamid</b> $C_7H_{10}N_2O_2$ ; Reinheitsgrad 98 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumchlorid</b> NaCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumdesoxycholat</b> $C_{24}H_{39}NaO_4$	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten
<b>Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat</b> $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumdodecylsulfat</b> SDS; $C_{12}H_{25}NaO_4S$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumhydroxid</b> NaOH	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Paraformaldehyd</b> PFA; $OH(CH_2O)_nH$ (mit n = 8 bis 100)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Pepstatin A</b> Proteaseinhibitor	Roche, Rotkreuz, Schweiz
<b>Phenylmethylsulfonylfluorid</b> PMSF; $C_7H_7FO_2S$	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat</b> Tween-20; $C_{38}H_{114}O_{26}$	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten
<b>Proteinanalyse-Farbstoffkonzentrat</b> Coomassie-Brillant-Blau G250, 50 % Phosphorsäure, 25 % Methanol, $H_2O$	Bio-Rad, Hercules, Vereinigte Staaten
<b>Roti-Mount FluorCare</b> Einbettungsmedium	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Salzsäure</b> HCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Stickstoff</b> flüssig	Linde, München, Deutschland
<b>Triton X-100</b> $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ (mit n = 9 bis 10)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor</b> Proteaseinhibitor	Roche, Rotkreuz, Schweiz
<b>Materialien</b>	
<b>Abstandshalter</b> für Polyacrylamid-Gelelektrophorese; 22,3 cm Höhe, 1,5 mm Dicke	Bio-Rad, Hercules, Vereinigte Staaten
<b>Äußere Glasplatten</b> für Polyacrylamid-Gelelektrophorese; 20 cm Breite, 22,3 cm Höhe	Bio-Rad, Hercules, Vereinigte Staaten
<b>Bechergläser</b> Glas; für Volumen bis 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL	Duran, Mainz, Deutschland
<b>Deckgläser</b> Glas; Durchmesser 18 mm	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten
<b>Dewargefäße</b> Glasgefäß; Edelstahlumhüllung, wärmeisolierter Kunststoffdeckel	KGW, Karlsruhe, Deutschland
<b>Erlenmeyerkolben</b> Glas; für Volumen bis 100 mL, 250 mL, 500 mL	Duran, Mainz, Deutschland
<b>Flaschenaufsatzfilter</b> Polyethersulfon-Membran; Porengröße 0,2 $\mu m$ oder 0,45 $\mu m$	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten
<b>Immobilon-PSQ</b> Polyvinylidenfluorid-Membran; Porengröße 0,2 $\mu m$	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Innere Glasplatten</b> für Polyacrylamid-Gelelektrophorese; 20 cm Breite, 20 cm Höhe	Bio-Rad, Hercules, Vereinigte Staaten

<b>Kämme</b> für Polyacrylamid-Gelelektrophorese; 25 Geltaschen, 1,5 mm Dicke	Bio-Rad, Hercules, Vereinigte Staaten
<b>Laborflaschen</b> Glas; Schraubverschluss, Volumen bis 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL	Duran, Mainz, Deutschland
<b>Magnetrührstäbchen</b> diverse Durchmesser und Längen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Messpipetten</b> Glas; für Volumina bis 1,0 mL, 2,0 mL, 5,0 mL, 10 mL oder 25 mL	Brand, Wertheim, Deutschland
<b>Mikropipettenspitzen</b> Kunststoff; für Volumina bis 20 µL, 200 µL oder 1000 µL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<b>Mikro-Schraubröhren</b> Kunststoff; Schraubverschluss, Nennvolumen 1,5 mL oder 2,0 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<b>Mikrotiterplatten</b> Kunststoff; mit 12 oder 96 Vertiefungen	Greiner, Kremsmünster, Österreich
<b>Objekträger</b> Glas; Maße 26 mm Breite, 76 mm Höhe, 1,0 mm Dicke	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten
<b>Parafilm</b> Folie aus Parafinwachs-Polyethylen-Mischung	Brand, Wertheim, Deutschland
<b>TC-Schale 100, Standard</b> Petrischale; Kunststoff, mit Deckel, Durchmesser 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<b>Pinzetten</b> diverse Größen	verschiedene Hersteller
<b>Reaktionsgefäße</b> Kunststoff; anhängender Deckel, Nennvolumen 1,5 mL oder 2,0 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<b>Reaktionsgefäße</b> Polyallomer; anhängender Deckel, Nennvolumen 1,5 mL oder 2,0 mL	Beckman Coulter, Brea, Vereinigte Staaten
<b>Saugflaschen</b> Erlenmeyerform; mit Glas-Olive	Duran, Mainz, Deutschland
<b>Schraubröhren</b> Kunststoff; Schraubverschluss, Nennvolumen 15 mL oder 50 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<b>Spritzenvorsatzfilter</b> Polyethersulfon-Membran, Porengröße 0,2 µm oder 0,45 µm	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten
<b>Styroporboxen</b> diverse Größen	verschiedene Hersteller
<b>Whatman-Papier</b> 3,0 mm und 0,34 mm Dicke	GE Healthcare, Little Chalfont, England
<b>Zählkammern SD 100</b> für Cellometer Auto T4	Nexcelom, Lawrence, Vereinigte Staaten
<b>Zellkultur-Filtereinsätze</b> für Mikrotiterplatten, Polyethylenterephthalat-Membran	Greiner, Kremsmünster, Österreich
<b>Zellschaber</b> Klingen aus thermoplastischen Elastomeren	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 3.3: Antikörper und Peptide, genutzte Verdünnungen und Konzentrationen.

Bezeichnung / Bemerkungen	Bezugsquelle / Hersteller	WB	FM
<b>Primärantikörper</b>			
<b>Alix Antibody (H-270)</b> Artikelnummer sc-99010; Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz, Dallas, Vereinigte Staaten	1:100	1:50
<b>Anti-Centrin</b> Artikelnummer C7736; Kaninchen, polyklonal	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten	-	1:500
<b>Anti-Hsc70 antibody (EP1531Y)</b> Artikelnummer ab51052; Kaninchen, monoklonal	Abcam, Milton, England	1:500	1:100

<b>Anti-Hsp60 antibody (Mab11-13)</b> Artikelnummer ab51052; Maus, monoklonal	Abcam, Milton, England	1:9000	1:5000
<b>Anti-Hsp90 antibody (S88)</b> Artikelnummer ab1429; Maus, monoklonal	Abcam, Milton, England	-	1:100
<b>Anti-Lactate Dehydrogenase Antibody</b> Artikelnummer ab7639; Ziege, polyklonal	Abcam, Milton, England	1:250	1:1000
<b>Caveolin-1 (D46G3) XP Rabbit mAb</b> Artikelnummer 3267; Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling, Cambridge, England	-	1:100
<b>galectin-3 (M3/38)</b> Artikelnummer sc-23938; Ratte, monoklonal	Santa Cruz, Dallas, Vereinigte Staaten	1:200	1:100
<b>GAPDH, mAb (1D4)</b> Artikelnummer ADI-CSA-335-E; Maus, monoklonal	Enzo, New York, Vereinigte Staaten	1:500	1:200
<b>HSP70 Antibody (4G4)</b> Artikelnummer sc-59569; Maus, monoklonal	Santa Cruz, Dallas, Vereinigte Staaten	1:100	1:100
<b>HSP70 Antibody (K-20)</b> Artikelnummer sc-1060; Ziege, polyklonal	Santa Cruz, Dallas, Vereinigte Staaten	1:2000	1:100
<b>HSP90 Antibody</b> Artikelnummer 4874; Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling, Cambridge, England	1:500	-
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase <math>\alpha</math> (H-3)</b> Artikelnummer sc-48345; Maus, monoklonal	Santa Cruz, Dallas, Vereinigte Staaten	1:1000	1:100
<b>Purified Mouse Anti-Actin Ab-5</b> Artikelnummer 612656; Maus, monoklonal	BD, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten	1:500	1:200
<b>Purified Mouse Anti-Caveolin 1</b> Artikelnummer 610058; Maus monoklonal	BD, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten	1:250	-
<b>Purified Mouse Anti-CD29</b> Artikelnummer 610468; Maus, monoklonal	BD, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten	1:500	-
<b>Purified Mouse Anti-E-Cadherin</b> Artikelnummer 610182; Maus, monoklonal	BD, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten	1:200	-
<b>Purified Mouse Anti-<math>\beta</math>-Catenin</b> Artikelnummer 610153; Maus, monoklonal	BD, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten	1:250	-
<b><math>\alpha</math>-Tubulin (YL1/2)</b> Artikelnummer sc-53029; Ratte, monoklonal	Santa Cruz, Dallas, Vereinigte Staaten	1:100	1:400
<b>Sekundärantikörper</b>			
<b>AlexaFluor488 Chicken anti-Goat IgG</b> Artikelnummer A-21467; Huhn, polyklonal	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten	-	1:200
<b>AlexaFluor488 Chicken anti-Mouse IgG</b> Artikelnummer A-21200; Huhn, polyklonal	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten	-	1:200
<b>AlexaFluor488 Chicken anti-Rabbit IgG</b> Artikelnummer A-21441; Huhn, polyklonal	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten	-	1:200
<b>AlexaFluor546 Donkey anti-Mouse IgG</b> Artikelnummer A-10036; Esel, polyklonal	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten	-	1:200
<b>AlexaFluor546 Goat anti-Rabbit IgG</b> Artikelnummer A-11010; Ziege, polyklonal	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten	-	1:200
<b>AlexaFluor546 Goat anti-Rat IgG</b> Artikelnummer A-11081; Ziege, polyklonal	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten	-	1:200
<b>AlexaFluor647 Chicken anti-Goat IgG</b> Artikelnummer A-21469; Huhn, polyklonal	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten	-	1:200
<b>AlexaFluor647 Chicken anti-Mouse IgG</b> Artikelnummer A-21463; Huhn, polyklonal	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten	-	1:200
<b>AlexaFluor647 Chicken anti-Rat IgG</b> Artikelnummer A-21472; Huhn, polyklonal	Thermo Fisher, Waltham, Vereinigte Staaten	-	1:200
<b>Goat Anti-Mouse IgG - HRP conjugate</b> Artikelnummer 170-6516; Ziege, polyklonal	Bio-Rad, Hercules, Vereinigte Staaten	1:2000	-
<b>Goat Anti-Rabbit IgG - HRP conjugate</b> Artikelnummer 170-6515; Ziege, polyklonal	Bio-Rad, Hercules, Vereinigte Staaten	1:2000	-

<b>Goat Anti-Rat IgG - HRP conjugate</b> Artikelnummer A110-205P; Ziege, polyklonal	Bethyl, Montgomery, Vereinigte Staaten	1:2000	-
<b>Rabbit Anti-Goat IgG - HRP conjugate</b> Artikelnummer 172-1034; Kaninchen, polyklonal	Bio-Rad, Hercules, Vereinigte Staaten	1:2000	-
<b>Peptide</b>			
<b>5(6)-Carboxyfluorescein-TTDS-NRLLLTG-OH</b>	JPT, Berlin, Deutschland	10,4 $\mu$ M	10,4 $\mu$ M
<b>5(6)-Carboxyfluorescein-TTDS-NRNNNTG-OH</b>	JPT, Berlin, Deutschland	10,4 $\mu$ M	10,4 $\mu$ M

### 3.2 Zellkultur

Alle im Rahmen der Zellkultur erforderlichen Arbeitsschritte wurden, sofern nicht explizit anders beschrieben, unter strengster Beachtung der allgemein bekannten Grundsätze für steriles Arbeiten durchgeführt. In Ermangelung destillierten Wassers wurde Leitungswasser durch eine Kombination von Umkehrosmose, Ionentausch, Aktivkohlefiltration, Elektrodeionisation, UV-Bestrahlung und Ultrafiltration aufgereinigt und das resultierende hochreine Wasser (hH<sub>2</sub>O) für sämtliche Anwendungen genutzt. Falls erforderlich, wurden gebrauchsfertige Puffer, Lösungen, Medienzusätze und Kulturmedien autoklaviert, in jedem Falle aber vor Nutzung unter Verwendung von Filtern mit 0,2  $\mu$ m Porengröße filtriert. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen erfolgten alle Tätigkeiten sequentiell sowie mit separaten Puffern, Lösungen und Medien für jede einzelne Zelllinie. Vor dem Übergang zur jeweils nächsten Zelllinie wurden alle erforderlichen Materialien und Geräte gründlichst mit Desinfektionslösungen behandelt (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Zusammensetzung der Desinfektionslösungen.

Komponente / Bemerkungen	Konzentration
<b>Desinfektionslösung, allgemein</b>	
Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	70 % (v/v)
hochreines Wasser (hH <sub>2</sub> O)	30 % (v/v)
<b>Desinfektionslösung, empfindliche Kunststoffe</b>	
Isopropanol (iso-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH)	70 % (v/v)
hochreines Wasser (hH <sub>2</sub> O)	30 % (v/v)

#### 3.2.1 Zelllinien

Die im Rahmen des Dissertationsprojektes analysierten Zellen der Zelllinien T47D und MCF7 wurden freundlicherweise von Frau Professor Doktor Gabriele Multhoff (Klinik und Poliklinik für Radio-Onkologie und Strahlentherapie, Klinikum rechts der Isar, Tech-

nische Universität München), die U2OS-Zellen von Frau Doktor Katharina Schlereth (Fachbereich Medizin, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Philipps-Universität Marburg) und die HK2-Zellen von Herrn Professor Doktor Andre Le Bivic (Institut für Entwicklungsbiologie Marseille, Universität Aix-Marseille) zur Verfügung gestellt. Die HeLa-Zellen stammten aus Beständen der eigenen Arbeitsgruppe und wurden lebenswürdigerweise von Frau Doktor Tamara Straube (Fachbereich Medizin, Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg) übereignet.

Bei den T47D handelt es sich um eine humane Mammakarzinom-Zelllinie, die von Keydar *et al.* durch Punktion eines metastatischen Bereiches einer 54-jährigen kaukasischen Frau gewonnen wurde, welche an einem invasiven Duktalkarzinom der Brust litt (Keydar *et al.*, 1979). Die T47D-Zellen enthalten mit etwa 66 Chromosomen einen aneuploiden Chromosomensatz, zeigen grundsätzlich eine epitheliale Morphologie und wachsen adhärent sowie bevorzugt in Form einer einzelnen Zellschicht. Auch die Zelllinie MCF7 gehen auf ein humanes Mammakarzinom zurück. Diese Zellen wurden von Soule *et al.* aus dem Pleurapunktat einer 69 Jahre alten Frau kaukasischen Ursprungs isoliert, welches im metastatischen Bereich eines invasiven Brust-Adenokarzinoms entnommen worden war (Soule *et al.*, 1973). Die MCF7-Zellen weisen mit 66 bis 87 Chromosomen ebenfalls einen aneuploiden Chromosomensatz auf, wachsen adhärent und sind als epitheliale Zellen charakterisiert. Im Gegensatz zu den T47D-Zellen breiten sie sich jedoch nicht bevorzugt horizontal aus, sondern wachsen auch in vertikaler Richtung, wobei sie domartige Strukturen bilden.

Die Zelllinie U2OS, ursprünglich als 2T bezeichnet, entstammt einem moderat differenzierten Osteosarkom der Tibia einer 15 Jahre jungen kaukasischen Frau (Pontén und Saksela, 1967). Die U2OS-Zellen zeigen oftmals einen hypertriploiden Chromosomensatz, wobei die Chromosomenanzahl ursprünglich mit 34 bis 38 Chromosomen, nebst einer nicht näher bestimmten Anzahl von Chromosomenfragmenten, beziffert wurde. Ähnlich wie die T47D-Zellen sind auch die U2OS-Zellen von epithelialer Morphologie, wachsen adhärent und bevorzugt in Form einer einlagigen Zellschicht.

Die Zelllinie HeLa geht auf Zellen zurück, die Gey *et al.* aus einer Gewebeprobe isolierten, welche dem Zervix-Adenokarzinom einer 31-jährigen afroamerikanischen Frau entnommen worden war (Lucey *et al.*, 2009). Die für HeLa-Zellen dokumentierte Anzahl an Chromosomen ist variabel, im Mittel weisen die Zellen etwa 80 Chromosomen auf (Frattini *et al.*, 2015), von welchen einige Insertionen von Desoxyribonukleinsäuren humaner Papillomviren enthalten (Landry *et al.*, 2013). Auch HeLa-Zellen weisen eine epitheliale Morphologie und adhärentes Wachstum auf.

Die Zelllinie HK2 ist auf Zellen einer Niere zurückzuführen, welche einem erwachsenen Mann ursprünglich zu Transplantationszwecken entnommen worden war (Ryan *et al.*, 1994). Aufgrund eines Einschnittes am oberen Nierenpol wurde das Organ für die geplante Transplantation jedoch als ungeeignet eingestuft, weshalb gesunde Zellen des proximalen Tubulusepithels isoliert und durch Transduktion mit replikationsdefekten retroviralen Vektoren immortalisiert wurden. HK2-Zellen bilden bei Kultivierung auf permeablen Filtern nach Erreichen der Konfluenz ein einschichtiges Epithel, wobei die Zellen eine deutlich ausgeprägte polare Morphologie entwickeln. Daher werden HK2-Zellen unter anderem als Modellsystem für die Analyse des polarisierten Proteintransports genutzt.

### 3.2.2 Kultivierung

Zur Kultivierung der T47D-, MCF7-, U2OS- und Hela-Zellen wurde das ursprünglich von Eagle als minimal-essentielles Medium entwickelte und von Dulbecco modifizierte Basismedium genutzt (nach der englischen Bezeichnung "*Dulbecco's modified Eagle Medium*" nachfolgend als DMEM bezeichnet; Dulbecco und Freeman, 1959). Für die Anlage von Kryokulturen (siehe Abschnitt 3.2.4) sowie die den Abbildungen 4.1 bis 4.6 zugrundeliegenden biochemischen und fluoreszenzmikroskopischen Analysen wurde eine DMEM-Variante ohne Natriumpyruvat verwendet. Aufgrund der Einstellung der Produktion letzteren Mediums musste für alle weiteren Analysen auf eine DMEM-Variante umgestellt werden, welche 1,0 mM Natriumpyruvat enthielt. Im Falle der HeLa-Zellen kam grundsätzlich die DMEM-Variante ohne Natriumpyruvat zum Einsatz, für die HK2-Zellen wurde als Basismedium eine Kombination des Natriumpyruvat enthaltenden DMEM mit dem von Ham entwickelten F12-Medium genutzt (Ham, 1965).

Entsprechend den Anforderung der jeweiligen Zelllinie wurden die Basismedien um fötales Kälberserum (FKS), verschiedene Aminosäuren, Antibiotika, rekombinanten Epidermalen Wachstumsfaktor (gemäß der englischen Bezeichnung "*Epidermal Growth Factor*" nachfolgend mit EGF abgekürzt) oder 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES) ergänzt (Einzelheiten siehe Tabelle 3.5).

Die Kultivierung der Zellen aller fünf Zelllinien erfolgte in den jeweils erforderlichen Kulturgefäßen in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5,0 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und hoher Luftfeuchtigkeit. Zur Anlage von Kryokulturen sowie für alle biochemischen Experimente wurden Plastikpetrischalen mit 10 cm Durchmesser als Kulturgefäße genutzt. Im Falle der fluoreszenzgestützten Analysen kamen Mikrotiterplatten mit 12 Vertiefungen zum Einsatz, welche vor der Aussaat der Zellen entweder mit Deckgläschen oder mit Zellkultur-

Filtereinsätzen entsprechenden Durchmessers bestückt wurden. Die Filtereinsätze bestanden aus einem Plastikzylinder, dessen Unterseite durch eine Membran aus Polyethylenterephthalat (PET) abgeschlossen wurde. Diese permeable Membran unterstützte etwa im Falle der HK2-Zellen die Entwicklung einer polaren Zellmorphologie. Der Wechsel des jeweils erforderlichen Kulturmediums erfolgte alle zwei bis drei Tage, wobei grundsätzlich im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmte Lösungen und Medien genutzt wurden.

**Tabelle 3.5: Zusammensetzung der Kulturmedien.**

<b>Basismedium / Anteil</b>	<b>Ergänzung / Abwandlung</b>
<b>Kulturmedium T47D, MCF7, U2OS, HeLa</b>	
<b>Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (90 % [v/v])</b>	0,0 mM <b>Natriumpyruvat</b> 25 mM <b>Glukose</b> 2,0 mM <b>L-Glutamin</b> 10 % (v/v) <b>FKS</b> 200 Einheiten/mL <b>Penicillin</b> 0,1 mg/mL (w/v) <b>Streptomycin</b>
<b>Kulturmedium T47D, MCF7, U2OS</b>	
<b>Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (90 % [v/v])</b>	1,0 mM <b>Natriumpyruvat</b> 25 mM <b>Glukose</b> 2,0 mM <b>L-Glutamin</b> 10 % (v/v) <b>FKS</b> 200 Einheiten/mL <b>Penicillin</b> 0,1 mg/mL (w/v) <b>Streptomycin</b>
<b>Kulturmedium HK2</b>	
<b>Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (45 % [v/v])</b> <b>Hams F-12 Medium (45 % [v/v])</b>	1,0 mM <b>Natriumpyruvat</b> 5,6 mM <b>Glukose</b> 1,5 mM <b>L-Alanyl-L-Glutamin</b> 10 % (v/v) <b>FKS</b> 10 µg/mL (w/v) <b>EGF</b> 15 mM <b>HEPES</b> 0,06 mg/mL (w/v) <b>Gentamicin</b>

Eine Prüfung auf Kontamination durch Bakterien der Gattung *Mycoplasma* wurde von Frau Waltraud Ackermann alle zwei bis drei Monate routinemäßig mittels Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Im Falle der genannten Zelllinien traten diesbezüglich während der gesamten Dauer des Dissertationsprojektes keinerlei Auffälligkeiten auf.

### 3.2.3 Passage

Bis zum Erreichen der für die geplanten Experimente erforderlichen Zellmengen wurden die Zellen in Plastikpetrischalen kultiviert und passagiert, sobald eine Kultur 80 bis 90 % Konfluenz erreicht hatte. Hierzu wurden die alten Kulturmedien entfernt, die Zellen zweifach mit Zellkultur-Puffer gespült (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.6) und im Anschluss

in Dissoziations-Lösung inkubiert (20 min, 37 °C; Zusammensetzung siehe Tabelle 3.6). Diese Lösung enthielt unter anderem Trypsin sowie Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und ermöglichte es, die adhärenen Zellen in Suspension zu bringen. Danach wurden die resultierenden Zelllösungen mit dem jeweils zehnfachen Volumen des erforderlichen Kulturmediums gemischt, um die Konzentrationen von Trypsin und EDTA auf ein unbedenkliches Maß zu reduzieren. Schließlich wurden neue Petrischalen mit jeweils einem Zehntel der entsprechenden Zelllösung sowie dem erforderlichen Volumen an Kulturmedium befüllt und die Kultivierung der Zellen wie zuvor beschrieben fortgesetzt (siehe Abschnitt 3.2.2). Stand eine ausreichende Menge von zu 80 bis 90 % konfluent bewachsenen Petrischalen zur Verfügung, wurden die Zellen wie zuvor beschrieben von den Böden gelöst. Die Anzahl der in der Dissoziations-Lösung enthaltenen Zellen wurde entweder mittels einer Zählkammer oder eines automatischen Zellzählers bestimmt. Im Anschluss wurden die Zelllösungen mit den jeweiligen Kulturmedien auf Volumina verdünnt, welche die für den experimentellen Ansatz erforderlichen Zellzahlen enthielten, in die notwendigen Kulturgefäße transferiert und diese mit Kulturmedium aufgefüllt. Die anschließende Kultivierung der Zellen erfolgte wie zuvor beschrieben (siehe Abschnitt 3.2.2).

**Tabelle 3.6: Zusammensetzung von Zellkultur-Puffer und Dissoziations-Lösung.**

Komponente / Bemerkungen	Konzentration
<b>Zellkultur-Puffer</b>	
Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	8,9 mM
Kaliumchlorid (KCl)	2,7 mM
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,5 mM
Natriumchlorid (NaCl)	136,9 mM
in $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,4 (nicht eingestellt)	
<b>Dissoziations-Lösung</b>	
Ethylendiamintetraacetat (EDTA; $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ )	0,48 mM
Trypsin	0,02 mM
in Zellkultur-Puffer (pH 7,4, nicht eingestellt)	

### 3.2.4 Langzeitlagerung und Rekultivierung

Unmittelbar nach Lieferung der T47D-, MCF7-, U2OS- und HK2-Zellen wurden Kryokulturen angelegt, die jedem einzelnen Versuchsdurchgang als Ausgangskultur dienten. Hierdurch sollte eine fortschreitende Akkumulation genetischer Defekte, welche bei kontinuierlicher Kultivierung zwangsläufig auftreten würde, weitestgehend unterbunden werden. Zur Herstellung der Kryokulturen wurden die Zellen zunächst in Kultur genommen (siehe Ab-



schnitt 3.2.2) und subkultiviert (siehe Abschnitt 3.2.3), bis 30 zu jeweils 80 bis 90 % konfluent bewachsene Petrischalen zur Verfügung standen. Dann wurden die Zellen mittels Dissoziations-Lösung in Suspension gebracht (siehe Abschnitt 3.2.3), mit dem zehnfachen Volumen des entsprechenden Kulturmediums verdünnt und durch Zentrifugation für fünf Minuten (5,0 min) bei hundertfacher mittlerer Erdbeschleunigung ( $100 \times g$ ) und Raumtemperatur (RT) pelletiert. Die Zellpellets wurden in jeweils 1,5 mL Kryomedium resuspendiert (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.7), in 2,0 mL fassende Mikro-Schraubröhrchen transferiert und zunächst für 24 Stunden in einer Einfrierhilfe bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Abschließend wurden die Kryokulturen in einen mit Flüssigstickstoff gefüllten Lagerbehälter überführt und dort bis zur weiteren Verwendung bei  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

**Tabelle 3.7: Zusammensetzung der Kryomedien.**

Komponente / Bemerkungen	Konzentration
<b>Kryomedien</b>	
Je nach Zelllinie erforderliches <b>Kulturmedium</b>	90 % (v/v)
<b>Dimethylsulfoxid</b> (DMSO; $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ )	10 % (v/v)

Zur Reaktivierung der konservierten Zellen wurden die Kryokulturen zunächst aufgetaut (3,0 min, RT), die Zellsuspensionen mit dem jeweils siebenfachen Volumen des erforderlichen Kulturmediums verdünnt und die Zellen durch Zentrifugation (5,0 min,  $100 \times g$ , RT) pelletiert. Die Pellets wurden in Kulturmedium resuspendiert und die resultierenden Zellsuspensionen in Petrischalen transferiert. Die anschließende Inkubation der Zellen für drei Tage sowie die Subkultivierung in den jeweils erforderlichen Kulturgefäßen erfolgte wie zuvor beschrieben (siehe Abschnitte 3.2.2 und 3.2.3).

### 3.2.5 Hitzeschock

Die Stressexposition der Zellen erfolgte in beheizbaren Wasserbädern ohne  $\text{CO}_2$ -Zufuhr. Hierzu wurden zunächst Subkulturen der erforderlichen Zellzahl in Kulturgefäßen angelegt, die dem jeweiligen experimentellen Ansatz entsprachen (siehe Abschnitte 3.2.2 und 3.2.3). Danach wurden die Zellen für 36 bis 72 Stunden unter physiologischen Bedingungen in einem  $\text{CO}_2$ -Inkubator kultiviert (siehe Abschnitte 3.2.2). Für den eigentlichen Hitzeschock wurden die Kulturen nach Ablauf der jeweiligen Vorkultivierungsphase zügig in auf  $40,5$  oder  $44\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorgeheizte Wasserbäder transferiert und dort für 25 Minuten belassen. Gemessen wurde hierbei der Zeitraum zwischen der Platzierung des letzten Kulturgefäßes und der Entnahme des zuerst eingebrachten Gefäßes. Danach wurden die Kulturen

umgehend in den CO<sub>2</sub>-Inkubator zurückgebracht und dort bis zum Ende des jeweils erforderlichen Erholungszeitraums unter physiologischen Bedingungen inkubiert.

### 3.3 Biochemische Methoden

Die Durchführung aller im Rahmen der biochemischen Analysen erforderlichen Arbeitsschritte und Inkubationsphasen erfolgte, abgesehen von einigen wenigen Ausnahmen, mit entsprechend vorgekühlten Puffern und Lösungen bei 4,0 bis 5,0 °C auf Eis oder in Kühlschränken. Gebrauchsfertige Puffer und Lösungen wurden vor Nutzung - wenn nicht gesondert vermerkt - mittels Filtern von 0,2 µm oder 0,45 µm Porengröße einfach filtriert.

#### 3.3.1 Zellaufschluss und Fraktionierung

Zur Herstellung von zellkernfreien Homogenaten wurden zunächst Subkulturen von jeweils  $1,0 \times 10^7$  Zellen in Petrischalen angelegt und die Zellen nach der Aussaat zunächst für 24 Stunden wie zuvor beschrieben kultiviert (siehe Abschnitte 3.2.2 und 3.2.3). Danach wurden die jeweils erforderlichen Kulturmedien gegen FKS-freie Medien ausgetauscht und die Kultivierung für 12 Stunden fortgesetzt.

**Tabelle 3.8: Zusammensetzung von Homogenisierungs- und Proteaseinhibitions-Lösung.**

Komponente / Bemerkungen	Konzentration
<b>Homogenisierungs-Lösung</b>	
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	20 mM
Kaliumchlorid (KCl)	10 mM
Natriumchlorid (NaCl)	10 mM
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	5,0 mM
Dithiothreitol (DTT; C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> )	1,0 mM
in <b>hH<sub>2</sub>O</b> , pH mit Natriumhydroxid (NaOH) auf 7,4 eingestellt	
<b>Proteaseinhibitions-Lösung</b>	
Antipain Dihydrochlorid	1,48 µM
Aprotinin	0,77 µM
Dimethylsulfoxid (DMSO; C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	5,2 % (v/v)
Leupeptin Hydrochlorid	10,8 µM
Pepstatin A	1,46 µM
Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor	6,33 µM
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> FO <sub>2</sub> S)	975,90 µM
in <b>Zellkultur-Puffer</b> (pH 7,4, nicht eingestellt), nicht filtriert	

Nach Abschluss der Kultivierungsphase wurden die Medien entfernt, die Zellen zweifach mit Zellkultur-Puffer gespült (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.6), der Puffer sorgfältig entfernt und durch 500 µL Homogenisierungs-Lösung sowie 20 µL Proteaseinhibitions-

Lösung je Petrischale ersetzt (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.8). Danach wurden die Zellen mittels eines Zellschabers abgelöst, die resultierenden Zellsuspensionen in 2,0 mL fassende Reaktionsgefäße überführt, mittels eines Vortexmischers für 30 Sekunden (30 sec) bei 2500 Umdrehungen pro Minute ( $2500 \text{ min}^{-1}$ ) sowie RT gründlich durchmischt und durch fünffaches Schockgefrieren (je 3,0 min,  $-196 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; Flüssigstickstoff) und Auftauen (3,0 min,  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; Heizblock) aufgeschlossen. Eventuell verbleibende intakte Zellen und Zellkerne wurden durch zweifache Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit pelletiert (je 20 min,  $1.000 \times g$ ,  $4,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), die resultierenden Überstände in 1,5 mL fassende Polyallomer-Reaktionsgefäße überführt und die Zellsuspensionen durch zweistündige Zentrifugation bei hoher Geschwindigkeit (2,0 h,  $100.000 \times g$ ,  $4,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) jeweils in eine zytosolische und eine die Gesamtheit der zellulären Membranen umfassende Fraktion getrennt. Anschließend wurden die Überstände in 1,5 mL fassende Reaktionsgefäße überführt und die Pellets mittels eines Vortexmischers in jeweils 250  $\mu\text{L}$  Homogenisierungspuffer resuspendiert (1,0 h,  $2500 \text{ min}^{-1}$ ,  $4,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der resultierenden Fraktionen erfolgte unmittelbar im Anschluss wie nachfolgend beschrieben.

### 3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen und Probenvorbereitung

Die quantitative Bestimmung der Gesamtproteinkonzentrationen der Proben erfolgte nach der von Bradford etablierten photometrischen Methoden (Bradford, 1976) unter Nutzung eines Proteinanalyse-Farbstoffkonzentrats (Coomassie-Brillant-Blau G250 gelöst in 50 % Phosphorsäure, 25 % Methanol und 25 % Wasser) sowie in Anlehnung an das durch den Hersteller bereitgestellte Protokoll zur Proteinanalyse mittels Mikrotiterplatten.

Hierzu wurde zunächst aus einer Stammlösung von Bovinem Serumalbumin (BSA; 10 mg/mL in Homogenisierungs-Lösung) eine Verdünnungsreihe angesetzt (0,05 mg/mL bis 0,5 mg/mL in Homogenisierungs-Lösung), dann das Farbstoffkonzentrat im Verhältnis eins zu vier mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und unter Verwendung von Filtern mit 0,2  $\mu\text{m}$  Porengröße filtriert. Im Anschluss wurden je drei Nöpfchen von Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen mit jeweils 10  $\mu\text{L}$  der einzelnen BSA-Verdünnungen sowie der zu analysierenden Homogenate und Fraktionen befüllt (Dreifachbestimmung), jeweils 200  $\mu\text{L}$  des verdünnten Farbstoffkonzentrats hinzugegeben und die Lösungen gründlich durchmischt (10 min,  $30 \text{ min}^{-1}$ , RT; Plattformschüttler). Die anschließende Analyse der Proben erfolgte durch Messung der Absorption bei 595 nm mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes in zwei getrennten Messungen im Abstand von 15 Minuten. Die Ergebnisse der Messungen wurden in die Software "Excel" importiert, aus den Messwerten der einzelnen BSA-Verdünnungen Stan-

dardkurven und entsprechende Ausgleichsgeraden erstellt und die Gesamtproteinkonzentrationen anhand der Steigungen der Ausgleichsgeraden berechnet. Unmittelbar im Anschluss wurden die Konzentrationen der zu vergleichenden Homogenate und Fraktionen durch Verdünnung in Homogenisierungs-Lösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.8) sowie entsprechender Volumina des sechsfach-Probenpuffers angeglichen. Bei letzterem Puffer handelte es sich um einen abgewandelten, hochkonzentrierten Laemmli-Probenpuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.9; Laemmli, 1970). Abschließend wurden die Proben kurz aufgekocht (5,0 min, 95 °C; Heizblock) und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 3.9: Zusammensetzung des Probenpuffers.**

Komponente / Bemerkungen	Konzentration
<b>Probenpuffer</b>	
<b>Bromphenolblau</b> (C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S)	0,003 % (w/v)
<b>Dithiothreitol</b> (DTT; C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> )	500 mM
<b>Glycerin</b> (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> )	30 % (w/v)
<b>Natriumdodecylsulfat</b> (SDS; C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S)	12 % (w/v)
<b>2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol</b> (Tris; C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	350 mM
in <b>hH<sub>2</sub>O</b> , pH mit Salzsäure (HCl) auf 6,8 eingestellt, nicht filtriert	

### 3.3.3 Tricin-Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung der in den Proben enthaltenen Proteine erfolgte in Anlehnung an die von Schägger und von Jagow etablierte N-(Tri[hydroxymethyl]methyl)glycin-Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (aufgrund des im englischen Sprachgebrauch als "Sodium Dodecyl Sulfate" bezeichneten und mit "SDS" abgekürzten Natriumdodecylsulfats nachfolgend als Tricin-SDS-PAGE abgekürzt; Schägger und Jagow, 1987). Zur Optimierung der Auflösung fand eine Variante des Verfahrens mit Harnstoff enthaltenden Trenngelen Anwendung (Schägger, 2006). Hierzu wurden zunächst die erforderlichen Stammlösungen und Puffer angesetzt, wenn erforderlich filtriert und bis zur weiteren Verwendung bei entsprechenden Temperaturen gelagert (Zusammensetzungen und Lagerungstemperaturen siehe Tabelle 3.10). Für die biochemischen Analysen wurden grundsätzlich großformatige Trenngele mit einer Polyacrylamid-Konzentration von 9,8 % sowie Sammelgele mit einer Polyacrylamid-Konzentration von 4,1 % verwendet. Massen und Volumen der zur Herstellung eines Trenngels von 16 cm Höhe, 18 cm Breite und 2,0 mm Dicke sowie eines entsprechenden Sammelgel erforderlichen Stammlösungen und Chemikalien können Tabelle 3.11 entnommen werden.

Zur Vorbereitung der Gellösungen wurden zunächst die erforderlichen Harnstoff-Massen in 50 mL fassende Reaktionsgefäße transferiert und in den notwendigen Volumina dH<sub>2</sub>O, Gelpuffer- sowie Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung aufgelöst (1,0 h, 30 min<sup>-1</sup>, RT; Überkopfschüttler; Trenngel-Lösung A). Reinigung und Trocknung der benötigten Glasplatten und Abstandshalter, Assemblierung der Gelkammern und Einspannung derselben in die erforderlichen Gießvorrichtungen erfolgten parallel. Die Lösungen wurden unter Verwendung von Filtern mit 0,2 µm Porengröße einfach filtriert und entgast (45 min, RT). Dann wurden je 30 mL entnommen und die notwendigen Volumina Natriumdodecylsulfat-Stammlösung und Ammoniumperoxodisulfat-Stammlösung sowie N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) hinzugefügt (Trenngel-Lösung B).

**Tabelle 3.10: Zusammensetzung der Tricin-SDS-PAGE-Lösungen.**

Komponente / Bemerkungen	Konzentration
<b>Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung</b>	
Acrylamid (C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO)	6,75 M
N,N'-Methylenbisacrylamid (Bisacrylamid; C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) in hH <sub>2</sub> O; Lagerung bei 4,0 bis 5,0 °C	97,30 mM
<b>Natriumdodecylsulfat-Stammlösung</b>	
Natriumdodecylsulfat (SDS; C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S) in hH <sub>2</sub> O; Lagerung bei RT	346,74 mM
<b>Ammoniumperoxodisulfat-Stammlösung</b>	
Ammoniumperoxodisulfat (APS; [NH <sub>4</sub> ] <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ) in hH <sub>2</sub> O; Lagerung in Portionen zu je 1,5 mL bei -20 °C	438,21 mM
<b>Gelpuffer-Stammlösung</b>	
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (Tris; C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ) in hH <sub>2</sub> O, pH mit Salzsäure (HCl) auf 8,45 eingestellt; Lagerung bei RT	3,0 M
<b>Anodenpuffer-Stammlösung</b>	
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (Tris; C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ) in hH <sub>2</sub> O, pH mit Salzsäure (HCl) auf pH 8,90 eingestellt; Lagerung bei RT	1,0 M
<b>Kathodenpuffer-Stammlösung</b>	
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (Tris; C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	1,0 M
N-(Tri[hydroxymethyl]methyl)glycin (Tricin; C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>5</sub> )	1,0 M
Natriumdodecylsulfat (SDS; C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S) in hH <sub>2</sub> O, pH nicht eingestellt; Lagerung bei RT	34,67 mM

Nach kurzem Durchmischen der Komponenten (30 sec, 2500 min<sup>-1</sup>, RT; Vortexmischer) wurden die resultierenden, viskosen Trenngel-Flüssigkeiten zügig in die Gelkammern gefüllt, vorsichtig mit zuvor im Verhältnis eins zu zwei in dH<sub>2</sub>O verdünnter Gelpuffer-Stammlösung überschichtet und die Gelkammern ruhend gelagert (18 h, 4,0 bis 5,0 °C).

Letzteres sollte eine gleichmäßige Polymerisation der Trenngele gewährleisten. Danach wurde der verdünnte Gelpuffer wieder entfernt, die Sammelgel-Lösungen analog zur beschriebenen Vorgehensweise vorbereitet (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.11) und die Trenngele mit den Sammelgel-Lösungen überschichtet. Das Einfügen der erforderlichen Kämme sowie zwei kurze Inkubationsphasen zwecks gleichmäßiger Polymerisation der Sammelgele (1,0 h, RT sowie 2,0 h, 4,0 bis 5,0 °C) schlossen den Herstellungsprozess ab.

**Tabelle 3.11: Zusammensetzung der Lösungen für Trenn- (9,8 %) und Sammelgel (4,1 %).**

Komponente / Bemerkungen	Konzentration
<b>Trenngel-Lösung A</b>	
Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung	8,0 mL
Gelpuffer-Stammlösung	13,333 mL
Harnstoff (C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO)	14,41 g
hochreines Wasser (hH <sub>2</sub> O)	7,339 mL
nochmals filtriert, entgast (45 min, RT)	
<b>Trenngel-Lösung B</b>	
Ammoniumperoxodisulfat-Stammlösung	180 µL
Natriumdodecylsulfat-Stammlösung	300 µL
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED; C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> )	16 µL
Trenngel-Lösung A	30 mL
ruhend gelagert (18 h, 4,0 bis 5,0 °C)	
<b>Sammelgel-Lösung</b>	
Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung	1,0 mL
Ammoniumperoxodisulfat-Stammlösung	180 µL
Gelpuffer-Stammlösung	3,0 mL
hochreines Wasser (hH <sub>2</sub> O)	7,68 mL
Natriumdodecylsulfat-Stammlösung	120 µL
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED; C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> )	20 µL
ruhend gelagert (1,0 h, RT; 2,0 h, 4,0 bis 5,0 °C)	

Unmittelbar nach Fertigstellung der Polyacrylamid-Gele wurden die Kämme entnommen, die Geltaschen mit dH<sub>2</sub>O ausgespült, dieses wieder möglichst rückstandslos entfernt und die Gelkammern in die Gelelektrophorese-Apparaturen eingespannt. Danach wurden die Anodentanks bis auf Höhe der Sammelgele mit zuvor im Verhältnis eins zu neun in dH<sub>2</sub>O verdünnter, vorgekühlter Anodenpuffer-Stammlösung aufgefüllt. Die anschließende Beladung der Gele erfolgte "trocken", indem Volumina der in Probenpuffer aufgenommenen Homogenate und Fraktionen von jeweils 13 µg Gesamtproteingehalt (Einzelheiten siehe Abschnitt 3.3.2) sowie entsprechender Proteinstandards zunächst kurz aufgeköcht (5,0 min, 95 °C; Heizblock) und nach kurzer Abkühlungsphase (5,0 min, RT) in die Geltaschen

pipettiert wurden. Nach Überschichtung der Proben mit vorgekühlter, im Verhältnis eins zu neun in dH<sub>2</sub>O verdünnter Kathodenpuffer-Stammlösung erfolgte die Elektrophorese bei konstanter Stromstärke sowie automatisch angepasster Spannung (20 h, 30 mA pro Gel, 4,0 bis 5,0 °C) und unter leichter Bewegung des Anodenpuffers (15 min<sup>-1</sup>; Magnetrührer).

### 3.3.4 Westernblot

Die Übertragung der in den Polyacrylamid-Gelen enthaltenen Proteine auf feste Trägermembranen sowie die anschließende indirekte Immundetektion erfolgten in Anlehnung an die von Towbin *et al.* beschriebene Variante des Westernblots (Towbin *et al.*, 1979). Hierbei kamen aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) bestehende Membranen und ein der Größe der Polyacrylamid-Gele angemessener Transfertank zum Einsatz. Mit Ausnahme der Westernblot-Puffer-Stammlösung wurden alle weiteren hierzu erforderlichen Puffer unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt und - mit Ausnahme des Transfer-Puffers - unter Verwendung von Filtern mit 0,2 µm Porengröße einfach filtriert. Die Zusammensetzungen von Stammlösung und Puffern sind nachfolgender Tabelle zu entnehmen.

**Tabelle 3.12: Zusammensetzung der Westernblot-Lösungen.**

Komponente / Bemerkungen	Konzentration
<b>Transfer-Puffer</b>	
<b>2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol</b> (Tris; C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	25 mM
<b>Glycin</b> (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	192 mM
<b>Methanol</b> (CH <sub>3</sub> OH)	10 % (v/v)
<b>Natriumdodecylsulfat</b> (SDS; C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S)	1,73 mM
in hH <sub>2</sub> O, pH nicht eingestellt, nicht filtriert; jeweils frisch angesetzt	
<b>Westernblot-Puffer-Stammlösung</b>	
<b>2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol</b> (Tris; C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	100 mM
<b>Natriumchlorid</b> (NaCl)	1,54 M
in hH <sub>2</sub> O, pH nicht eingestellt; Lagerung bei RT	
<b>Westernblot-Puffer</b>	
<b>Westernblot-Puffer-Stammlösung</b>	10 % (v/v)
in hH <sub>2</sub> O, pH auf 7,4 mit Salzsäure (HCl) eingestellt; jeweils frisch angesetzt	
<b>Blockierungs-Puffer</b>	
<b>Hefeextrakt</b>	2,5 % (w/v)
<b>Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat</b> (Tween-20; C <sub>58</sub> H <sub>114</sub> O <sub>26</sub> )	0,1 % (w/v)
<b>Westernblot-Puffer-Stammlösung</b>	10 % (v/v)
in hH <sub>2</sub> O, pH auf 7,4 mit Salzsäure (HCl) eingestellt; jeweils frisch angesetzt	

In Vorbereitung des Tanktransfers wurden die PVDF-Membranen zunächst in reinem Methanol aktiviert (1,0 min, RT), das Methanol durch zweimaliges Spülen sowie kurzfristige

Inkubation in  $\text{hH}_2\text{O}$  wieder entfernt (5,0 min, RT) und die Membranen sowie alle für den Transfer-Stapel benötigten Materialien für mindestens 15 Minuten bei RT in Transfer-Puffer inkubiert (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.12). Parallel wurden die Polyacrylamid-Gele aus den Gelelektrophorese-Apparaturen entnommen und in vorgekühltem Transfer-Puffer bei leichter Bewegung equilibriert (15 min,  $15 \text{ min}^{-1}$ ,  $4,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Plattformschüttler). Danach erfolgte die Assemblierung der Transfer-Stapel in mit Transfer-Puffer gefüllten Kunststoffbehältern. Hierzu wurden zunächst die Kathoden-Platten in die Behälter gelegt und auf diesen je ein poröser Kunststoffschwamm, ein Stück Whatman-Papier (Dicke 3,0 mm) und ein Polyacrylamid-Gel platziert. Dann wurden die PVDF-Membranen vorsichtig auf die Gele gelegt, eventuell vorhandene Luftblasen mittels einer Glaspipette entfernt, die Membranen mit jeweils einem weiteren Stück Whatman-Papier (Dicke 0,34 mm) sowie einem porösen Kunststoffschwamm abgedeckt und die Anoden-Platten aufgebracht. Der Proteintransfer erfolgte nach Füllung der Transfer-Tanks mit den entsprechenden Volumina des Transfer-Puffers und Einsetzen der Transfer-Stapel bei konstanter Spannung und automatisch angepasster Stromstärke (20 h, 12 V,  $4,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ) sowie unter ständiger Bewegung des Puffers ( $15 \text{ min}^{-1}$ ; Magnetrührer). Nach Abschluss des Proteintransfers wurden die PVDF-Membranen durch zweimaliges Spülen sowie kurzfristige Inkubation in  $\text{hH}_2\text{O}$  gereinigt (5,0 min, RT) und zunächst auf Whatman-Papieren (Dicke 0,34 mm) entsprechender Größe lichtgeschützt getrocknet (48 h, RT).

Zur anschließenden indirekten Immundetektion der jeweiligen Zielproteine wurden die Membranen zunächst wie zuvor beschrieben aktiviert und in Blockierungs-Puffer bei leichter Bewegung inkubiert (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.12), um die verbleibenden Proteinbindestellen zu blockieren (2,0 h,  $45 \text{ min}^{-1}$ , RT; Plattformschüttler). Danach wurden die jeweils erforderlichen Primärantikörper-Lösungen in Blockierungs-Puffer verdünnt (genutzte Primärantikörper und Verdünnungen siehe Tabelle 3.3), die notwendigen Volumina zusammen mit den Membranen in Kunststoffbeutel eingeschweißt und zuerst für 16 Stunden bei  $4,0 \text{ }^\circ\text{C}$ , dann für 2,5 Stunden bei RT und leichter Bewegung inkubiert ( $20 \text{ min}^{-1}$ ; Überkopfschüttler). Im Anschluss wurden die Primärantikörper durch dreifaches Waschen der Membranen (je 10 min,  $45 \text{ min}^{-1}$ , RT; Plattformschüttler) mit Blockierungs-Puffer wieder entfernt, die erforderlichen Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper in Blockierungs-Puffer verdünnt (genutzte Sekundärantikörper und Verdünnungen siehe Tabelle 3.3) und zusammen mit den Membranen nach Einschweißen in Kunststoffbeuteln erneut bei leichter Bewegung inkubiert (2,0 h,  $20 \text{ min}^{-1}$ , RT; Überkopfschüttler). Dann wurden die Sekundärantikörper durch dreifaches Waschen der Membranen (je 10



min, 45 min<sup>-1</sup>, RT; Plattformschüttler) mit Westernblot-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.12) wieder entfernt, das Chemilumineszenz-Substrat durch Mischung der beiden gebrauchsfertig gelieferten Detektionsreagenzien im Verhältnis eins zu eins vorbereitet und die Membranen sowie die entsprechende Volumina der Substratlösungen in Kunststoffbeutel eingeschweißt. Die anschließende Detektion der Immunkonjugate, beziehungsweise die Visualisierung der Chemilumineszenz-Signale, erfolgte mittels eines entsprechend ausgestatteten digitalen Bildgebungssystems. Abschließend wurden Rückstände des Chemilumineszenz-Substrates durch dreifaches Waschen der Membranen mit hH<sub>2</sub>O entfernt (je 20 min, 45 min<sup>-1</sup>, RT; Plattformschüttler) und die Membranen bis zur weiteren Verwendung auf Whatman-Papieren entsprechender Größe lichtgeschützt bei RT gelagert.

### **3.4 Fluoreszenzmikroskopie und Fluorimetrie**

Unabhängig davon, dass die jeweils erforderlichen Stammlösungen und Medien-Komponenten meist bereits filtriert vorlagen, wurden ausnahmslos alle im Rahmen der fluoreszenzbasierten Analysen genutzten Kulturmedien, Puffer und Lösungen vor Gebrauch unter Verwendung von Filtern mit 0,2 µm Porengröße nochmals zweifach filtriert.

#### **3.4.1 Fluoreszenzmarkierung von Zielmolekülen und Fluoreszenzmikroskopie**

Im Falle der fluoreszenzmikroskopischen Analysen wurden zunächst Zellkultur-Filtereinsätze oder autoklavierte Deckgläschen in die zwölf Vertiefungen entsprechender Mikrotiterplatten transferiert und auf diesen Subkulturen von  $3,0 \times 10^4$  oder  $6,7 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung angelegt (siehe Abschnitte 3.2.2 und 3.2.3). Nach der Aussaat erfolgte die Kultivierung der Zellen je nach experimentellem Ansatz für 36, 48 oder 72 Stunden wie zuvor beschrieben (siehe Abschnitte 3.2.2). Zwölf Stunden vor Beginn der jeweiligen Experimente wurden die Kulturmedien gegen FKS-freie Kulturmedien ausgetauscht. Danach erfolgte zunächst - falls erforderlich - die Markierung subzellulärer Strukturen mittels fluoreszierender Farbstoffe beziehungsweise Fluorochrom-gekoppelter Peptide oder die Entfernung von glykosylierungsabhängig gebundenem Galektin-3 mittels Laktose.

Zur Markierung zellulärer Membranen wurden die erforderlichen Farbstoff-Lösungen auf 37 °C vorgewärmt (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.13), die Kulturmedien gegen die Farbstoff-Lösungen ausgetauscht und die Kultivierung bei 37 °C für fünf Minuten fortgesetzt. Bei Nutzung Fluorochrom-gekoppelter Peptide erfolgten die Inkubationsphasen entweder durchgängig bei 37 °C oder aber bei 4,0 °C. Im ersten Falle wurden die Kulturmedien durch auf 37 °C vorgewärmte Mikroskopie-Peptid-Lösungen ersetzt (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.13) und die Inkubation bei 37 °C für 80 Minuten fortgesetzt. Im zweiten

Fall wurden die Zellen zunächst für 20 Minuten bei 4,0 °C vorinkubiert, dann die Kulturmedien durch entsprechend vorgekühlte Peptid-Lösungen ausgetauscht und die Inkubation bei 4,0 °C für 80 Minuten fortgesetzt. Zur Entfernung des auf den Zelloberflächen an Glykoliganden gebundenen Galektin-3 wurden die Zellen für 20 Minuten bei 4,0 °C vorinkubiert, dann dreifach mit vorgekühltem Zellkultur-Puffer gespült und anschließend in vorgekühlter Laktose-Lösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.13) bei leichter Bewegung inkubiert (45 min, 20 min<sup>-1</sup>, 4,0 °C; Plattformschüttler). Die anschließende Präparation der Zellen erfolgte entweder unmittelbar im Anschluss oder nach indirekter Immunfluoreszenzmarkierung der Zielproteine wie nachfolgend beschrieben.

**Tabelle 3.13: Zusammensetzung von Membranfarbstoff-, Peptid- und Laktose-Lösungen.**

Komponente / Bemerkungen	Konzentration
<b>Membranfarbstoff-Lösung</b>	
<i>Cell Mask Deep Red Plasma Membrane Stain</i>	0,1 % (v/v)
in je nach Zelllinie erforderlichem, FKS-freiem <b>Kulturmedium</b> ; jeweils frisch angesetzt	
<b>Mikroskopie-Substratpeptid-Lösung</b>	
<b>5(6)-Carboxyfluorescein-TTDS-NRLLLTG-OH</b>	10,4 µM
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO; C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS)</b>	0,3 % (v/v)
in je nach Zelllinie erforderlichem, FKS-freiem <b>Kulturmedium</b> ; jeweils frisch angesetzt	
<b>Mikroskopie-Kontrollpeptid-Lösung</b>	
<b>5(6)-Carboxyfluorescein-TTDS-NRNNNTG-OH</b>	10,4 µM
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO; C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS)</b>	0,3 % (v/v)
in je nach Zelllinie erforderlichem, FKS-freiem <b>Kulturmedium</b> ; jeweils frisch angesetzt	
<b>Laktose-Lösung</b>	
<b>Laktose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>)</b>	150 mM
in <b>Zellkultur-Puffer</b> (pH 7,4, nicht eingestellt); jeweils frisch angesetzt	

Nach den Kultivierungs- beziehungsweise Vorbereitungsphasen wurden die Zellen mit vorgekühltem Mikroskopie-Puffer gewaschen (dreifach, je 2,5 min, 4,0 °C; Zusammensetzung siehe Tabelle 3.14), mittels vorgekühlter Paraformaldehyd-Lösung fixiert (45 min, 4,0 °C; Zusammensetzung siehe Tabelle 3.14) und das Fixans durch erneutes Waschen wieder entfernt (dreifach, je 5,0 min, 4,0 °C). War eine Permeabilisierung erforderlich, wurde diese unmittelbar im Anschluss an die Fixierung durch Inkubation der Zellen in Triton-X-100-Lösung realisiert (45 min, 4,0 °C; Zusammensetzung siehe Tabelle 3.14). Nach Abschluss der Permeabilisierungsphase wurden die nichtionischen Tenside durch Waschen mit Mikroskopie-Puffer wieder entfernt (dreifach; je 5,0 min, 4,0 °C). Sollten die Zielproteine indirekt fluoreszenzmarkiert werden, wurden sowohl die fixierten als auch die

nach Fixierung permeabilisierten Zellen in Blockierungs-Lösung inkubiert (1,0 h, 4,0 °C; Zusammensetzung siehe Tabelle 3.14). Hierdurch sollten unspezifischen Interaktionen der zu nutzenden Antikörper weitestgehend eingeschränkt werden. Zeitgleich wurden die Primärantikörper in Blockierungs-Lösung verdünnt (genutzte Antikörper und Verdünnungen siehe Tabelle 3.3) und bis zur weiteren Verwendung gekühlt gelagert.

**Tabelle 3.14: Zusammensetzung der Mikroskopie-Puffer und -Lösungen.**

Komponente / Bemerkungen	Konzentration
<b>Mikroskopie-Puffer-Stammlösung</b>	
<b>Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat</b> ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	30 mM
<b>Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat</b> ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	30 mM
<b>Natriumchlorid</b> (NaCl)	390 mM
in $\text{hH}_2\text{O}$ , pH nicht eingestellt; Lagerung bei RT	
<b>Mikroskopie-Puffer</b>	
<b>Mikroskopie-Puffer-Stammlösung</b>	33,33 % (v/v)
in $\text{hH}_2\text{O}$ , pH mit Natriumhydroxid (NaOH) auf 7,2 eingestellt; jeweils frisch angesetzt	
<b>Paraformaldehyd-Lösung</b>	
<b>Natriumhydroxid</b> (NaOH)	400 $\mu\text{M}$
<b>Paraformaldehyd</b> (PFA; $\text{OH}[\text{CH}_2\text{O}]_n\text{H}$ [mit $n = 8$ bis 100])	4,0 % (w/v)
<b>Mikroskopie-Puffer-Stammlösung</b>	10 % (v/v)
in $\text{hH}_2\text{O}$ , pH mit Salzsäure (HCl) auf 7,2 eingestellt; Lagerung in 20 mL Portionen bei -20 °C	
<b>Triton-X-100-Lösung</b>	
<b>Triton X-100</b> ( $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}[\text{C}_2\text{H}_4\text{O}]_n$ [mit $n = 9$ bis 10])	0,1 % (v/v)
in <b>Mikroskopie-Puffer</b> (pH 7,2, nicht eingestellt); jeweils frisch angesetzt	
<b>Blockierungs-Lösung</b>	
<b>Bovines Serumalbumin</b> (BSA)	1,0 % (w/v)
in <b>Mikroskopie-Puffer</b> (pH 7,2, nicht eingestellt); jeweils frisch angesetzt	
<b>Hoechst-33342-Lösung</b>	
<b>Hoechst 33342</b> ( $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{Cl}_3\text{N}_6\text{O}$ )	1,78 $\mu\text{M}$
in <b>Mikroskopie-Puffer</b> (pH 7,2, nicht eingestellt); jeweils frisch angesetzt	

Während der Blockierungsphasen wurden die feuchten Kammern assembliert. Letztere bestanden aus rechteckigen Kunststoffbehältern inklusive entsprechender Deckel, welche zuunterst mit je einer Lage Whatman-Papier von 3,0 mm Dicke, darüber mit einer Glasplatte sowie einer abschließenden Schicht Parafilm versehen und bis auf Höhe der jeweiligen Glasplatte mit  $\text{hH}_2\text{O}$  befüllt worden waren. Nach Abschluss der Blockierungsphase wurden die Deckgläschen einzeln aus den Mikrotiterplatten entnommen oder die Membranen aus den Zellkultur-Filtereinsätzen entfernt, in die feuchten Kammern transferiert und die Primärantikörper-Lösungen aufgebracht. Nach entsprechender Inkubationsphase (16 h,

4,0 °C) wurden die Primärantikörper durch Waschen mit Blockierungs-Lösung entfernt (fünffach; je 5,0 min, 4,0 °C), währenddessen die erforderlichen Sekundärantikörper in Blockierungs-Lösung verdünnt (genutzte Antikörper und Verdünnungen siehe Tabelle 3.3) und bis zur Verwendung gekühlt gelagert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Sekundärantikörper-Lösungen aufgebracht, die Proben nochmals inkubiert (2,0 h, 4,0 °C) und verbleibende, ungebundene Sekundärantikörper durch Waschen mit Mikroskopie-Puffer entfernt (dreifach; je 5,0 min, 4,0 °C). Eine anschließende Inkubation der Zellen in Hoechst-33342-Lösung (20 min, 4,0 °C; Zusammensetzung siehe Tabelle 3.14) zur Markierung der Desoxyribonukleinsäuren sowie das Entfernen verbleibender, freier Farbstoffe durch Waschen mit Mikroskopie-Puffer (dreifach; je 5,0 min, 4,0 °C) beendeten die Fluoreszenzmarkierung von Zielproteinen beziehungsweise Zielstrukturen.

Das abschließende Eindeckeln der Proben erfolgte, indem je 20 µL eines gebrauchsfertig gelieferten Einbettungsmediums auf Objektträger aufgebracht, die Deckgläschen kurz in  $\text{H}_2\text{O}$  getunkt, auf feinen Papiertüchern abgetropft und auf den Objektträgern platziert wurden. Zum Eindeckeln der Membranen wurde ähnlich verfahren, allerdings nach Platzierung derselben auf den Objektträgern zunächst ein zusätzlicher Tropfen Einbettungsmedium je Membran aufgebracht und diese erst dann mit Deckgläschen abgedeckt.

Nach Lagerung der Präparate für mindestens 72 Stunden bei 4,0 °C erfolgte die Analyse entsprechend den jeweiligen experimentellen Erfordernissen entweder mittels eines Laser-Scanning-Mikroskops oder eines klassischen Epifluoreszenz-Mikroskops, wobei jeweils Ölimmersionsojektive mit 40-facher oder 63-facher Vergrößerung genutzt wurden. Die Aufnahme von Bildstapeln mit maximal 0,4 µm Auflösung entlang der Z-Achse erfolgte grundsätzlich mittels des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops und unter Verwendung eines Ölimmersionsojektivs mit 40-facher Vergrößerung.

### **3.4.2 Fluorimetrische Messung von Fluoreszenzintensitäten**

Im Falle der Fluorochrom-gekoppelten Peptide erfolgten in Ergänzung der fluoreszenzmikroskopischen Analysen auch fluorimetergestützte Messungen von Fluoreszenzintensitäten. Hierzu wurden  $6,7 \times 10^5$  Zellen wie zuvor beschrieben entweder direkt in jede der 12 Vertiefungen entsprechender Mikrotiterplatten transferiert oder die Mikrotiterplatten mit Deckgläschen bestückt und die Zellen auf diesen ausgesät (siehe Abschnitte 3.2.2 und 3.2.3). In beiden Fällen folgte nach der Aussaat eine Kultivierungsphase von 72 Stunden. Die anschließende Vorbereitung der Proben erfolgte entweder mit entsprechend vorgewärmten Lösungen und durchgängig bei 37 °C oder mit vorgekühlten Lösungen und

durchgängig bei 4,0 °C. In beiden Fällen wurden die Zellen zunächst mit Zellkultur-Puffer gewaschen (dreifach; je 5,0 min; Zusammensetzung siehe Tabelle 3.6), danach für die jeweils erforderlichen Zeiträume mit den Fluorimetrie-Peptid-Lösungen inkubiert (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.15) und zwecks Entfernung freier Peptide in Zellkultur-Puffer gewaschen (dreifach; je 5,0 min). Bei Nutzung von Deckgläschen wurden diese im Anschluss in neue Mikrotiterplatten transferiert, vorsichtig mit Zellkultur-Puffer überschichtet und mittels eines als Fluorimeter verwendbaren Mikrotiterplatten-Lesegerätes analysiert.

**Tabelle 3.15: Zusammensetzung von Lyse-Puffer und Fluorimetrie-Peptid-Lösung.**

Komponente / Bemerkungen	Konzentration
<b>Lyse-Puffer</b>	
<b>2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol</b> (Tris; $C_4H_{11}NO_3$ )	20 mM
<b>Natriumchlorid</b> (NaCl)	50 mM
<b>Natriumdesoxycholat</b> ( $C_{24}H_{39}NaO_4$ )	12 mM
<b>Triton X-100</b> ( $C_{14}H_{22}O[C_2H_4O]_n$ [mit $n = 9$ bis $10$ ])	0,05 % (v/v)
in $hH_2O$ , pH mit Salzsäure (HCl) auf 8,0 eingestellt; Lagerung bei 4,0 °C	
<b>Fluorimetrie-Substratpeptid-Lösung</b>	
<b>5(6)-Carboxyfluorescein-TTDS-NRLLLTG-OH</b>	10,4 $\mu$ M
<b>Dimethylsulfoxid</b> (DMSO; $C_2H_6OS$ )	0,3 % (v/v)
in <b>Zellkultur-Puffer</b> (pH 7,4, nicht eingestellt); jeweils frisch angesetzt	
<b>Fluorimetrie-Kontrollpeptid-Lösung</b>	
<b>5(6)-Carboxyfluorescein-TTDS-NRNNNTG-OH</b>	10,4 $\mu$ M
<b>Dimethylsulfoxid</b> (DMSO; $C_2H_6OS$ )	0,3 % (v/v)
in <b>Zellkultur-Puffer</b> (pH 7,4, nicht eingestellt); jeweils frisch angesetzt	

Die direkt in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten kultivierten Zellen wurden analog zur bereits beschriebenen Homogenisierung aufbereitet (siehe Abschnitt 3.3.1), dabei jedoch durch Inkubation in Lyse-Puffer auch chemisch aufgeschlossen (45 min,  $30 \text{ min}^{-1}$ , 4,0 °C; Überkopfschüttler; Zusammensetzung des Lyse-Puffers siehe Tabelle 3.15). Danach wurden die Gesamtproteinkonzentrationen der Lysate wie zuvor beschrieben bestimmt und aneinander angeglichen (siehe Abschnitt 3.3.2). Die abschließende Analyse der Proben erfolgte ebenfalls mittels eines als Fluorimeter nutzbaren Mikrotiterplatten-Lesegerätes.

### 3.5 Datenerhebung, Datenauswertung und Statistik

Zur Quantifizierung von Westernblots wurde die Software "LabImage 1D" genutzt. Die fluorimetrischen Daten wurden mittels der Steuerungssoftware des Mikrotiterplatten-Lesegerätes erfasst. Zur Auswertung wurden die jeweils resultierenden Datensätze in das Programm "Excel" importiert, die sich aus den entsprechenden Messwerten ergebenden

Mittelwerte sowie Standardabweichungen berechnet und die Resultate in Diagrammform aufbereitet. Darüber hinaus notwendige einfaktorielle Varianzanalysen (aufgrund der englischen Bezeichnung "*Analysis of Variance*" auch unter der Abkürzung ANOVA bekannt) sowie die Korrekturen der entsprechenden Datensätze nach der Bonferroni-Methode wurden mittels der Software "GrapPad Prism" realisiert.

Im Falle der fluoreszenzmikroskopischen Analysen erfolgte die digitale Bildgebung mittels der Steuerungssoftware der genutzten Mikroskope. Für Quantifizierung und Aufbereitung fluoreszenzmikroskopischer Bilder wurde die Software "Leica Application Suite X" genutzt. Die Erstellung von Maximalprojektionen und 3D-Rekonstruktionen aus konfokalen Bildstapeln wurde mittels des Moduls "3D Viewer" derselben Software realisiert.

Die abschließende Zusammenfassung von Einzelbildern sowie die Erstellung von Übersichtsabbildungen erfolgte mittels des Programmes "Illustrator", gegebenenfalls erforderliche Anpassungen von Helligkeit und Kontrast wurden unter Verwendung der Software "Photoshop" vorgenommen. Als Textverarbeitungsprogramm kam die Software "Word" zum Einsatz, zur Literaturverwaltung wurde das Programm "Citavi" genutzt.

## 4 Ergebnisse

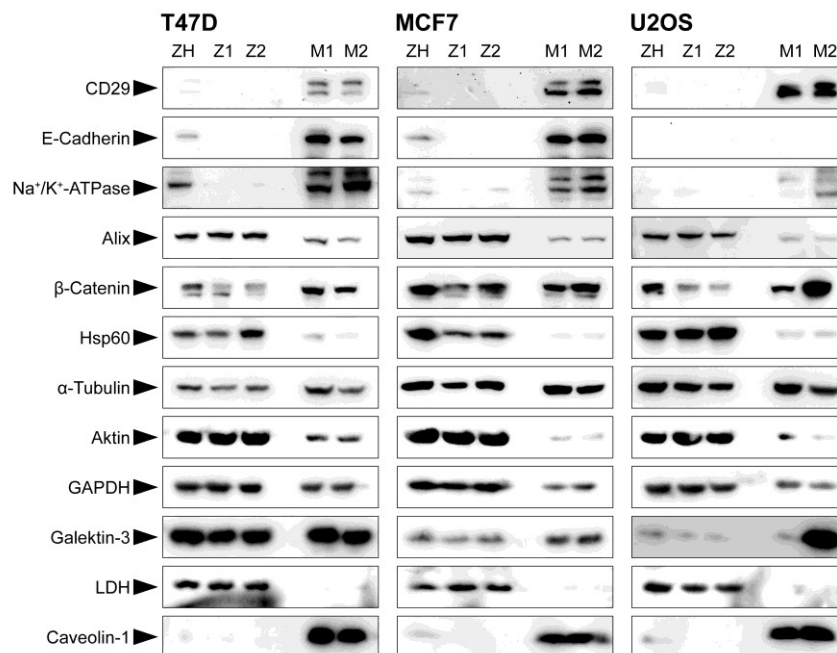
Im Unterschied zu gesunden Zellen weisen Tumorzellen allgemein eine erhöhte basale Expression von HSPA1A und HSPA1B auf (nachfolgend zusammenfassend als "Hsp70" bezeichnet), zweier stressinduzierbarer Vertreter der Familie der Hitzeschockproteine mit einem Molekulargewicht von 70 Kilodalton (kDa; Ciocca und Calderwood, 2005; Calderwood *et al.*, 2006). Darüber hinaus exponieren sie Hsp70 in beziehungsweise auf den Plasmamembranen als integrale, periphere oder Rezeptor-gebundene Proteine (Multhoff *et al.*, 1995). Hsp70 in Form integraler Plasmamembranproteine wurde bislang ausschließlich bei Tumorzellen nachgewiesen und fungiert als Erkennungsstruktur für natürliche Killerzellen, weshalb das Chaperon als wichtiger Tumormarker angesehen wird (Multhoff *et al.*, 1997; Multhoff und Hightower, 2011). Allerdings können unterschiedliche Tumorzelltypen etwa bezüglich basaler Expressionsintensitäten und Mengen des integralen Hsp70 erheblich differieren. Daher wurden im Rahmen des Dissertationsprojektes "Vergleichende Analyse von basaler und stressinduzierter Expression sowie Lokalisation der Hitzeschockproteine von 70 Kilodalton Molekulargewicht HSPA1A und HSPA1B (Hsp70) bei humanen Tumorzellen" die beiden Mammakarzinom-Zelllinien T47D und MCF7 sowie die Osteosarkom-Zelllinie U2OS bezüglich der genannten Eigenschaften detailliert charakterisiert. Hierdurch sollten Unterschiede und Gemeinsamkeiten identifiziert werden, die sich gegebenenfalls als Ansatzpunkte für Tumordiagnostik und Tumorthherapie eignen könnten.

### 4.1 Trotz unterschiedlicher basaler und stressinduzierter Expression von Hsp70 bleibt der zeitliche Verlauf der Stressantwort konstant

Zur biochemischen Charakterisierung der Hsp70-Stressantworten wurden die T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen entweder durchgängig bei 37 °C kultiviert oder zunächst einem nichtletalen Hitzeschock ausgesetzt (44 °C, 25 Minuten) und anschließend für Erholungsphasen von zwei bis 24 Stunden wiederum bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen homogenisiert, durch differentielle Zentrifugation verbliebene intakte Zellen und Zellkerne entfernt und die resultierenden zellkernfreien Homogenate - wenn erforderlich - in Zytopsol- und Membranfraktionen getrennt. Nach Bestimmung und Angleichung der Proteinkonzentrationen wurden die resultierenden Proben mittels N-(Tri[hydroxymethyl]methyl)glycin-Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (aufgrund des Englisch "*Sodium Dodecyl Sulfate*" genannten und mit "SDS" abgekürzten Natriumdodecylsulfats nachfolgend als "Tricin-SDS-PAGE" bezeichnet; Schägger und Jagow, 1987) und anschließend Westernblot sowie densitometrischer Quantifizierung analysiert.

#### 4.1.1 Die basalen Hsp70-Expressionsintensitäten der Zelllinien sind unterschiedlich

Nach erfolgter Fraktionierung wurde zunächst die Reinheit der Fraktionen verifiziert, indem Homogenate sowie Zytosol- und Membranfraktionen auf das Vorhandensein diverser Markerproteine geprüft wurden (Abbildung 4.1). Hierbei waren, mit Ausnahme des bei den U2OS-Zellen nicht detektierbaren E-Cadherins, alle weiteren Zielproteine in den Homogenaten oder den jeweils zu erwartenden Fraktionen der drei Zelllinien nachweisbar.



**Abbildung 4.1: Die differentielle Zentrifugation ermöglicht eine Anreicherung peripherer und integraler Membranproteine.** Zellkernfreie Homogenate (ZH) ungestresster (Z1, M1) sowie gestresster (Z2, M2; 44 °C, 25 Minuten, vier Stunden Erholungszeit bei 37 °C) T47D-, MCF7- und U2OS-Tumorzellen wurden in zytosolische (Z1, Z2) und Membranfraktionen (M1, M2) getrennt. Zehnprozentige Polyacrylamidgele wurden mit Proben von jeweils 13 Mikrogramm Gesamtproteingehalt beladen und die Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung auf Polyvinylidenfluorid-Membranen übertragen. Das Vorhandensein integraler (CD29, E-Cadherin, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Caveolin-1), überwiegend zytosolischer (LDH) sowie direkt oder indirekt mit Membranen interagierender beziehungsweise in subzellulären Kompartimenten enthaltener Proteine (Alix, β-Catenin, Hsp60, α-Tubulin, Aktin, GAPDH, LDH, Galectin-3) wurde durch Markierung der jeweiligen Zielproteine mit entsprechenden Primär- und Enzym-gekoppelten Sekundäntikörpern verifiziert.

Integrale Membranproteine konnten in den Zytosolfractionen entweder nicht detektiert werden (CD29, Wu *et al.*, 2004; E-Cadherin, Giepmans und van Ijzendoorn, 2009; Caveolin-1, Rothberg *et al.*, 1992) oder waren nur in Form sehr schwacher Banden nachweisbar (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Galva *et al.*, 2012). In Homogenaten und Membranfraktionen waren diese Proteine hingegen grundsätzlich detektierbar, wobei die Bandenintensitäten bei den Membranfraktionen grundsätzlich deutlich stärker ausgeprägt waren als bei den Homogenaten. Proteine hingegen, deren Vorhandensein auf der Oberfläche bestimmter Tumorzelltypen bereits nachgewiesen wurde (Hitzeschockprotein 60 kDa [Hsp60], Soltys und Gupta,



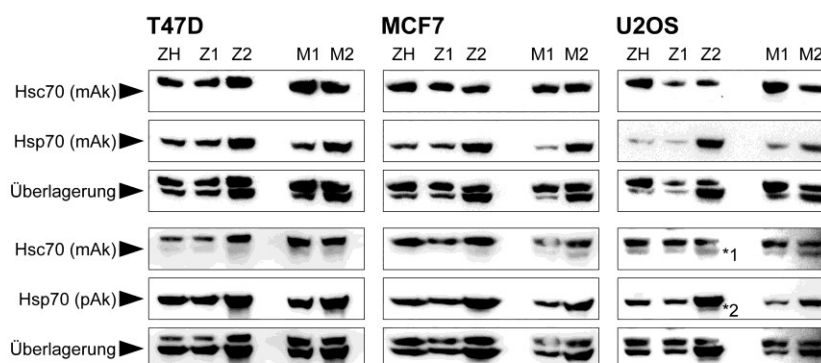
1996; Tubulin, Rubin *et al.*, 1982; Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase [GAPDH], Correa *et al.*, 2010), waren in beiden Fraktionen detektierbar. Gleiches galt für Proteine, die direkt mit Membranen beziehungsweise Membranlipiden interagieren können (ALG-2-interagierendes Protein X [Alix], Bissig *et al.*, 2013; Hsp60, Bruyn *et al.*, 2000; Tubulin, Caron und Berlin, 1987; Aktin, Gicquaud und Wong, 1994; GAPDH, Montalbano *et al.*, 2012; Galectin-3, Lukyanov *et al.*, 2005; Laktat-Dehydrogenase [LDH], Terlecki *et al.*, 2006), die direkt oder indirekt in Membranen verankert sind (Tubulin, Aktin,  $\beta$ -Catenin) oder die in subzellulären, von Membranen umschlossenen Strukturen enthalten sein können (Hsp60, Soltys und Gupta, 1996; Alix, Théry *et al.*, 2001).

Insgesamt betrachtet entsprachen die Ergebnisse somit den Erwartungen. Zwar konnte die absolute Reinheit der Fraktionen nicht abschließend beurteilt werden, da ursprünglich als ausschließlich zytosolisch lokalisiert betrachtete Proteine wie GAPDH und LDH (Sidibe *et al.*, 2007; Maryanovich *et al.*, 2012) zur direkten Interaktion mit Membranen fähig und somit als zytosolische Marker nicht geeignet sind (Terlecki *et al.*, 2006; Montalbano *et al.*, 2012). Jedoch gelang eine Anreicherung integraler sowie peripherer Membranproteine und es konnte davon ausgegangen werden, dass die Membranfraktionen neben subzellulären Membranen hauptsächlich Bestandteile von Plasmamembranen enthielten. Da mittels differentieller Zentrifugation somit eine ausreichende Trennung der erforderlichen Zellbestandteile erzielt werden konnte, wurde derselben für die folgenden Experimente der Vorzug vor der deutlich komplexeren Dichtegradientenzentrifugation gegeben.

Nachdem die Eignung des methodischen Ansatzes für die geplanten biochemischen Analysen verifiziert worden war, wurde die Spezifität der zur Verfügung stehenden Hsp70-Antikörper geprüft. Der polyklonale Antikörper sc-1060 soll gemäß den Angaben des Herstellers gegen ein synthetisches Peptid gerichtet sein, welches lediglich die C-terminale Region des humanen Hsp70 umfasst. Bei vorbereitenden Analysen mittels Westernblot hatte dieser Antikörper allerdings nicht nur eine, sondern zwei sehr nahe beieinanderliegende Banden geliefert. Bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers sc-59569 hingegen, für dessen Produktion laut Hersteller vollständiges, rekombinantes humanes Hsp70 als Antigen verwendet wurde, konnte stets nur eine einzelne Bande detektiert werden (vergleiche Abbildung 4.2). Daher wurden vergleichende Analysen mittels Westernblot durchgeführt, bei welchen HSPA8 (nach der englischen Bezeichnung "*Heat Shock Cognate 71 kDa Protein*" nachfolgend als "Hsc70" bezeichnet) als interne Referenz diente. Kreuzreaktionen der jeweils erforderlichen Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper, welche bei vorbereitenden Experimenten vereinzelt aufgetreten waren (vergleiche Abbildung 4.2),

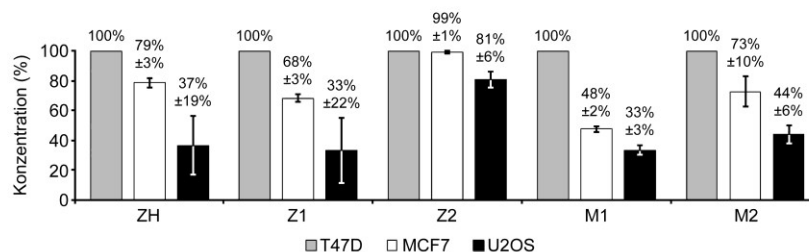
wurden durch Nutzung separater Westernblot-Membranen für die monoklonalen beziehungsweise polyklonalen Hsp70-Antikörper sowie sequentielle immunologische Markierung und Detektion von Hsp70 und Hsc70 soweit möglich minimiert.

### A (Western Blots)

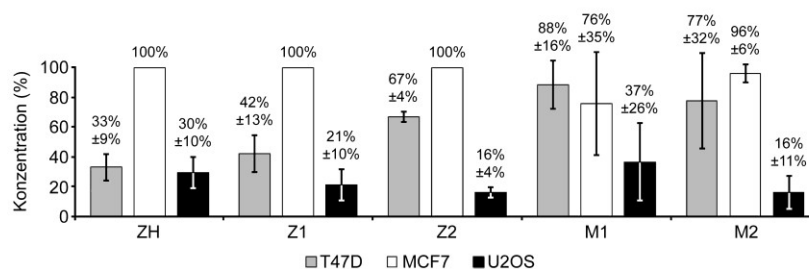


### B (Quantifizierung)

#### B1 (Hsp70)



#### B2 (Hsc70)



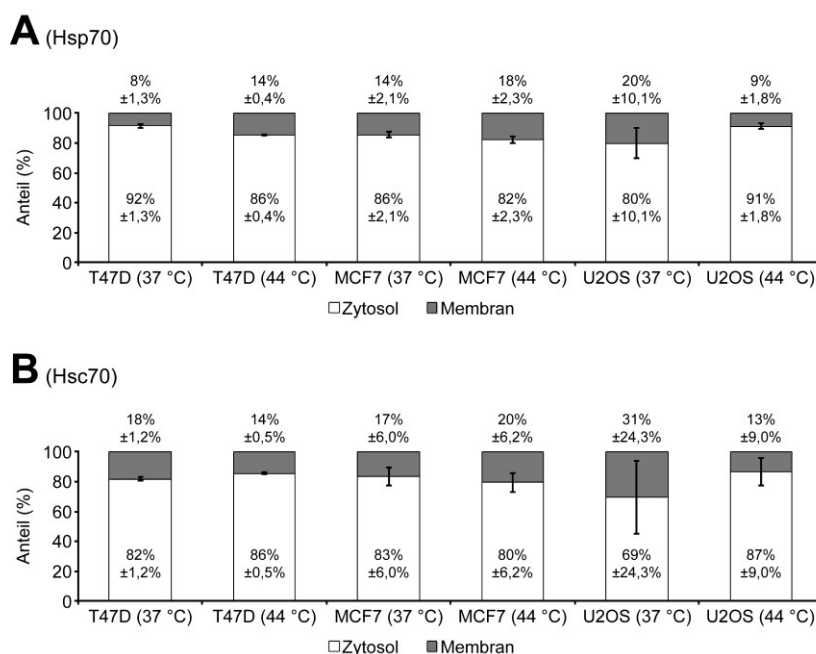
**Abbildung 4.2: Die Mammakarzinom-Zelllinien T47D und MCF7 zeigen eine höhere basale Expressionsintensität von Hsp70 als die Osteosarkom-Zelllinie U2OS.** Zellkernfreie Homogenate (ZH) ungestresster (Z1, M1) und gestresster Zellen (Z2, M2; 44 °C, 25 Minuten, vier Stunden Erholungszeit bei 37 °C) wurden in Zytosol- (Z1, Z2) und Membranfraktionen (M1, M2) getrennt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine (je 13 Mikrogramm Gesamtproteingehalt) wurden diese auf Polyvinylidenfluorid-Membranen übertragen. Danach wurde Hsp70 auf getrennten Membranen entweder mittels des polyklonalen Antikörpers (pAk) sc-1060 oder des monoklonalen Antikörpers (mAk) sc-59569 und entsprechender Sekundärantikörper markiert und detektiert. Nach densitometrischer Quantifizierung wurde die Bande mit der jeweils höchsten Intensität als 100 % definiert und die relativen Werte der anderen Banden dementsprechend umgerechnet. Danach wurde das beschriebene Verfahren für Hsc70 unter Nutzung des mAk ab51052 wiederholt. (A) Ergebnisse der einzelnen Westernblots und Überlagerungen der jeweils für Hsp70 und Hsc70 erfassten Banden. (B) Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierungen und Umrechnungen in Form von Säulendiagrammen. Zur besserer Vergleichbarkeit sind die entsprechenden Prozentwerte oberhalb der Säulen zusätzlich angegeben (Mittelwerte +/- Standardabweichung; n = 2). \*1 = Aus Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper resultierende zweite Bande. \*2 = Bei Nutzung des pAk sc-1060 auftretende zweite Bande.

Wie Abbildung 4.2 zeigt, lieferten beide Hsp70-Antikörper in Homogenaten sowie Zytosol- und Membranfraktionen aller Zelllinien jeweils Banden auf vergleichbarer Höhe. Auch die durch den Hitzeschock induzierten Änderungen der Bandenmuster und die relativen Bandenintensitäten waren ähnlich ausgeprägt. Die bei Nutzung des Hsc70-Antikörpers detektierbaren Banden lagen hingegen klar erkennbar oberhalb der entsprechenden Hsp70-Banden. Die Bandenmuster und Bandenintensitäten unterschieden sich deutlich von jenen, welche die Hsp70-Antikörper lieferten. Dementsprechend konnte davon ausgegangen werden, dass die beiden Hsp70-Antikörper zumindest Hsc70 nicht gebunden hatten. Darüber hinaus lag die bei Nutzung des polyklonalen Antikörpers sc-1060 vereinzelt auftretende zweite, schwache Bande nahe der eigentlichen Hsp70-Bande. Die zweite Bande war nur nachweisbar, wenn die Hsp70-Konzentration relativ zum Gesamtproteingehalt der Proben aufgrund des Hitzeschocks deutlich angestiegen war. Somit konnte eine Kreuzreaktivität des sc-1060-Antikörpers, etwa gegenüber anderen Mitgliedern der HSP70-Familie, zwar nicht endgültig ausgeschlossen werden. Doch ließ insbesondere das durch den Hitzeschock induzierte verstärkte Auftreten der zweiten Bande eher beginnenden enzymatischen Abbau des Zielproteins oder posttranslationale Modifikationen vermuten. Daher wurde der polyklonale Antikörper sc-1060 als für Hsp70 ausreichend spezifisch eingestuft.

Abgesehen von den beschriebenen, lediglich Fraktionierungsqualität und Antikörperspezifität betreffenden Ergebnissen, erlaubte der gewählte methodische Ansatz (Analyse von Proben gleicher Proteinkonzentration aller drei Zelllinien im Rahmen derselben Tricin-SDS-PAGE beziehungsweise desselben Westernblots) einen direkten Vergleich der basalen Expressionsintensitäten. Auch Vergleiche der prozentualen Verhältnisse zwischen zytosolischem und Membran-assoziiertem Hsc70 beziehungsweise Hsp70 wurden so ermöglicht. Bezüglich der basalen Hsp70-Expressionsintensitäten zeigten sich hierbei deutliche Unterschiede zwischen den Zelllinien (Abbildung 4.2 B): Relativ zum Gesamtproteingehalt und exklusive kernlokalisierter Proteine exprimierten die T47D- und MCF7-Mammakarzinom-Zellen unter physiologischen Bedingungen deutlich mehr Hsp70 als die U2OS-Osteosarkom-Zellen (T47D: 100 %; MCF7:  $70 \pm 3,0$  %; U2OS:  $37 \pm 19$  %). Hsc70 hingegen wurde von den MCF7-Zellen deutlich stärker exprimiert als von den T47D- und den U2OS-Zellen (MCF7: 100 %; T47D:  $33 \pm 9,0$  %; U2OS  $30 \pm 10$  %).

Bezüglich der prozentualen Verteilung der Chaperone auf Zytosol- und Membranfraktionen zeigten die Zelllinien hingegen deutliche Gemeinsamkeiten (Abbildung 4.3): Relativ zum Hsp70- beziehungsweise Hsc70-Gehalt der Zellen und exklusive der nukleären Chaperone enthielten die Zytosolfractionen mit etwa 90 % grundsätzlich den größten Anteil

sowohl des stressinduzierbaren Chaperons Hsp70 (T47D:  $92 \pm 1,3$  %; MCF7:  $86 \pm 2,1$  %; U2OS:  $80 \pm 10,1$  %), als auch des konstitutiv exprimierten Chaperons Hsc70 (T47D:  $82 \pm 1,2$  %; MCF7:  $83 \pm 6,0$  %; U2OS:  $69 \pm 24,3$  %). Diesbezüglich ergaben sich auch nach einem nichtletalen Hitzeschock keine statistisch signifikanten Änderungen.



**Abbildung 4.3: Stressinduziert ändern sich die prozentualen Verhältnisse zwischen zytosolisch lokalisiertem und Membran-assoziiertem beziehungsweise in subzellulären Kompartimenten enthaltenem Hsp70 und Hsc70 bei T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen nicht.** Zum Vergleich des Hsp70- beziehungsweise des Hsc70-Gehalts von Zytosolfractionen (weiß) und Membranfractionen (grau) wurden die in Abbildung 4.2 gezeigten Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der Westernblots anhand der bekannten Verdünnungsfaktoren mathematisch korrigiert. Die resultierenden Werte der Fraktionspaare wurden addiert, als 100 % definiert und darauf basierend die prozentualen Hsp70-Anteile (A) beziehungsweise Hsc70-Anteile (B) der Fraktionen errechnet. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden die sich aus der Nutzung beider Hsp70-Antikörper ergebenden Resultate zusammengefasst. Die Säulendiagramme zeigen die prozentualen Anteile von Hsp70 und Hsc70 an Zytosol- und Membranfractionen (Mittelwerte +/- Standardabweichungen; Hsp70: n = 4, Hsc70: n = 2) der Zellen vor (37 °C) und nach (44 °C) dem Hitzeschock.

#### 4.1.2 Die Expression von Alix, Galektin-3 und Hsc70 wird bei allen drei Zelllinien, die von GAPDH nur bei den MCF7- und U2OS-Zellen durch Stress beeinflusst

Um Beeinträchtigungen der biochemischen Analyse der durch einen Hitzeschock induzierten Hsp70-Expressionänderungen auszuschließen, wurde nach Prüfung der Fraktionierungseffizienz versucht, eine geeignete Ladekontrolle zu identifizieren. Idealerweise sollte es sich um ein Protein handeln, welches von allen drei Zelllinien synthetisiert wird, sowohl in Zytosol- als auch in Membranfractionen enthalten ist, sich bezüglich seiner Masse möglichst deutlich von Hsp70 unterscheidet und dessen Expression weder auf transkriptioneller, noch auf translationaler Ebene durch thermischen Stress beeinflusst wird. Diesbezüg-

lich waren jedoch keine alle drei genutzten Zelllinien umfassenden Informationen verfügbar. Lediglich bei Zytoskelett-Elementen konnte davon ausgegangen werden, dass deren Expression oder Struktur durch einen Hitzeschock beeinträchtigt wird (Pawlik *et al.*, 2013). Letzteres konnte im Rahmen vorbereitender Experimente für  $\beta$ -Aktin bestätigt werden: Dieses Strukturprotein wurde zumindest von T47D- und MCF7-Zellen nach einem Hitzeschock verstärkt exprimiert (vergleiche Anhang, Abbildung 9.1).

Weitere vorbereitende Analysen ließen darauf schließen, dass auch die Expression der Proteine  $\alpha$ -Tubulin,  $\beta$ -Catenin, Alix, Galektin-3 und GAPDH durch thermischen Stress beeinflusst werden kann, wenngleich bei den einzelnen Zelllinien in unterschiedlicher Ausprägung (vergleiche Anhang, Abbildung 9.2). Da somit eine verlässliche Ladekontrolle vorab nicht zweifelsfrei identifiziert werden konnte, erfolgte die Hsp70-Expressionanalyse für jede Tumorzelllinie und Fraktion separat. Um Fehlerquellen zumindest erkennen und deren Auswirkungen abschätzen zu können, wurde die Analyse auf die Proteine Alix, Galektin-3, GAPDH und Hsc70 ausgedehnt (Abbildung 4.4).

Die Ergebnisse der Experimente zeigten bei allen drei Zelllinien stressinduzierte Schwankungen der Konzentrationen des multifunktionellen Proteins Alix sowohl in den Zytosol-, wie auch in den Membranfraktionen (Abbildung 4.4 A). Zwar gestaltete sich der Nachweis des Proteins bei den beiden Mammakarzinom-Zelllinien T47D und MCF7 vergleichsweise schwierig, was im Rahmen der Quantifizierung zu relativ hohen Standardabweichungen führte. Trotzdem konnten auch bei diesen beiden Zelllinien statistisch signifikante beziehungsweise sehr signifikante Konzentrationsänderungen nachgewiesen werden, die auf einen sinusförmigen Verlauf der Expressionsschwankungen schließen ließen.

Bei den Zytosolfractionen der T47D-Zellen stieg die Alix-Konzentration zwischen zwei und acht Stunden zunächst um  $138 \pm 24 \%$ , entsprechend einer Verdopplung der Konzentration (Abbildung 4.4 A). Bis zehn Stunden blieb die Konzentration stabil auf dem erhöhten Niveau, sank danach langsam und erreichte 24 Stunden nach dem Hitzeschock wieder den Ausgangswert. Bei den T47D-Membranfraktionen erhöhte sich die Konzentration bis acht Stunden um  $199 \pm 113 \%$ , sank aber bereits zwischen acht und zehn Stunden wieder auf ein in etwa dem Nullstundenwert entsprechendes Niveau. Im Falle der MCF7-Zellen erhöhte sich die Alix-Konzentration in den Zytosolfractionen zwischen vier und sechs Stunden zunächst um  $100 \pm 43 \%$ , fiel bis 18 Stunden jedoch wieder auf den Ausgangswert. In den MCF7-Membranfraktionen erfolgte der Konzentrationsanstieg bereits zwischen zwei und vier Stunden, fiel mit  $49 \pm 14 \%$  jedoch vergleichsweise geringfügig aus. Das Niveau des Nullstundenwertes wurde hierbei schon nach acht Stunden wieder erreicht.

Im Gegensatz zu den beiden Mammakarzinom-Zelllinien konnte bei den U2OS-Osteosarkom-Zellen zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Erhöhung der Alix-Expression nachgewiesen werden. Vielmehr nahm die Konzentration des Proteins in beiden Fraktionen kontinuierlich ab: 24 Stunden nach dem Hitzeshock lagen die Alix-Konzentrationen in den U2OS-Zytosolfractionen um  $36 \pm 7,0$  % unter dem Zweistundenwert, in den U2OS-Membranfraktionen um  $51 \pm 17$  % unter dem entsprechenden Vierstundenwert.

Im Gegensatz zu Alix waren im Falle des  $\beta$ -Galaktoside-bindenden Proteins Galektin-3 bei allen drei Tumorzelllinien vergleichsweise niedrige Standardabweichungen zu verzeichnen (Abbildung 4.4 B). Dies ermöglichte die Identifikation statistisch sehr beziehungsweise höchst signifikanter Konzentrationsänderungen, welche bei den beiden Mammakarzinom-Zelllinien und der Osteosarkom-Zelllinie unterschiedlich ausgeprägt waren.

Bei den T47D-Zellen blieb die Galektin-3-Konzentration in den Zytosolfractionen bis etwa acht Stunden nach Stresseinwirkung zunächst konstant, sank zwischen acht und 24 Stunden aber um  $80 \pm 23$  % (Abbildung 4.4 B). In den T47D-Membranfraktionen stieg die Konzentration bis sechs Stunden zunächst um  $86 \pm 15$  %, blieb bis mindestens zwölf Stunden stabil auf dem erhöhten Niveau, sank danach langsam und lag nach 24 Stunden nur noch geringfügig über dem Nullstundenwert. Demgegenüber blieben die Konzentrationen von Galektin-3 im Falle der MCF7-Zellen in beiden Fraktionen bis etwa acht Stunden nach Stresseinwirkung konstant. Zwischen acht und 24 Stunden sanken die Konzentrationen jedoch um  $53 \pm 18$  % in den MCF7-Zytosolfractionen und um  $53 \pm 35$  % in den MCF7-Membranfraktionen. Bei den U2OS-Zellen hingegen war in beiden Fraktionen ein Anstieg der Konzentration von Galektin-3 nachweisbar. Bis sechs Stunden nach dem Hitzeschock stieg die Konzentration des zytosolischen Galektin-3 zunächst um  $70 \pm 16$  %, fiel bis 12 Stunden jedoch wieder auf den Ausgangswert. In den U2OS-Membranfraktionen stieg die Galektin-3-Konzentration bis acht Stunden geringfügig um  $34 \pm 10$  %, sank bis 24 Stunden jedoch wieder auf ein Niveau, welches dem der ungestressten Zellen entsprach.

Wie dargestellt variierten die stressinduzierten Expressionsmuster von Alix und Galektin-3 zum Teil nicht nur zwischen den Zelllinien, sondern auch zwischen den Zytosol- und Membranfraktionen derselben Zelllinie. Demgegenüber zeigte sich im Falle von GAPDH ein interessanter Zusammenhang zwischen der Ausprägung der Expressionsschwankung und dem jeweiligen basalen Hsp70-Expressionsniveau der Zellen (Abbildung 4.4. C).

Die Expression von GAPDH wurde nur bei den T47D-Zellen, also den Zellen mit dem höchsten basalen Hsp70-Expressionsniveau (vergleiche Abbildung 4.2), nicht durch den Hitzeschock beeinflusst (Abbildung 4.4 C). Im Gegensatz zu dieser Zelllinie waren bei den

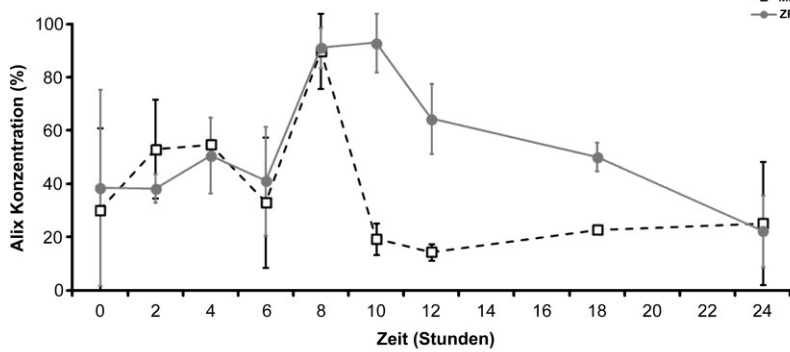
MCF7- und U2OS-Zellen zwar vergleichsweise geringfügige, gleichwohl aber statistisch signifikante Konzentrationsschwankungen nachweisbar. Im Falle der MCF7-Zellen, die unter physiologischen Bedingungen weniger Hsp70 exprimierten als die T47D-Zellen, sank die GAPDH-Konzentration in den Zytosolfractionen kontinuierlich und lag 24 Stunden nach dem Hitzeschock um  $34 \pm 9,0$  % unter dem Nullstundenwert. Demgegenüber stieg die Konzentration in den MCF7-Membranfraktionen zwischen vier und sechs Stunden zunächst um  $37 \pm 12$  %, sank bis 24 Stunden jedoch wieder auf den Ausgangswert. Bei den U2OS-Zellen hingegen, die ein deutlich geringeres basales Hsp70-Expressionsniveau aufwiesen als die beiden Mammakarzinom-Zelllinien, blieb die GAPDH-Konzentration in den Membranfraktionen weitgehend konstant. Die Konzentration des zytosolischen Enzyms jedoch stieg bis sechs Stunden nach Stresseinwirkung um  $98 \pm 24$  % an, entsprechend einer Verdopplung der Expression. Nach acht Stunden begann die GAPDH-Konzentration in den U2OS-Zytosolfractionen wieder zu sinken, lag nach 24 Stunden jedoch noch immer  $56 \pm 18$  % über dem Niveau der ungestressten Zellen.

Auch im Falle des konstitutiv exprimierten Hsc70 konnten statistisch signifikante beziehungsweise höchst signifikante stressinduzierte Konzentrationsänderungen nachgewiesen werden (Abbildung 4.4 D). Diese verliefen in beiden Fraktionen einer jeden Zelllinie grundsätzlich vergleichbar. Allerdings zeigten die MCF7- und U2OS-Zellen einen ähnlichen zeitlichen Verlauf der Hsc70-Stressantwort, welcher sich deutlich von jenem der T47D-Zellen unterschied. Letzteres ließ einen Zusammenhang zwischen der Hsc70-Stressantwort und dem basalen Hsp70-Expressionsniveau der Zellen vermuten.

Im Falle der T47D-Zellen erwiesen sich in beiden Fraktionen lediglich vergleichsweise geringfügige Konzentrationsverminderungen als statistisch signifikant (Abbildung 4.4 D). So reduzierte sich die Konzentration von Hsc70 zwischen sechs und 24 Stunden nach dem Hitzeschock in den Zytosolfractionen um  $38 \pm 16$  %, in den Membranfraktionen um  $57 \pm 4,0$  %. Die MCF7- und U2OS-Zelllinien hingegen zeigten einen deutlich ausgeprägten, sinusförmigen Verlauf der Konzentrationsschwankungen: Bis sechs Stunden stiegen die Hsc70-Konzentrationen in den MCF7-Zytosolfractionen um  $43 \pm 10$  %, in den MCF7-Membranfraktionen um  $94 \pm 24$  %. Bei diesen Zellen fielen die Konzentrationen bis 18 Stunden wieder auf die Niveaus der Nullstundenwerte. Bei den U2OS-Zellen zeigte sich bis sechs Stunden eine Konzentrationssteigerung von  $86 \pm 17$  % in den Zytosolfractionen sowie von  $22 \pm 9,0$  % in den Membranfraktionen. Nach 18 Stunden erreichte die Hsc70-Konzentration in den U2OS-Zytosolfractionen wieder den Ausgangswert, lag in den Membranfraktionen nach 24 Stunden aber noch um  $43 \pm 12$  % unter dem Nullstundenwert.

# A (Alix)

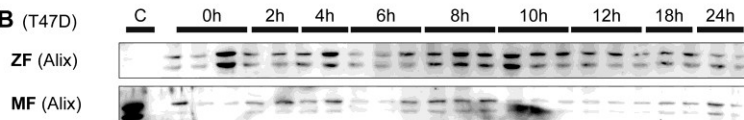
## DG (T47D)



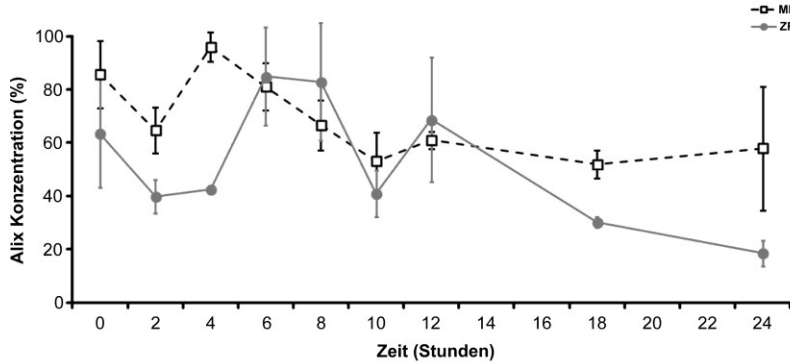
## TB (T47D)

F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	2h → 8h	+53 +/- 9 %p	*
ZF	2h → 10h	+55 +/- 12 %p	*
ZF	8h → 18h	-41 +/- 9 %p	*
ZF	8h → 24h	-69 +/- 15 %p	*
ZF	10h → 18h	-43 +/- 12 %p	*
ZF	10h → 24h	-71 +/- 17 %p	*
MF	0h → 8h	+60 +/- 34 %p	*
MF	4h → 8h	+35 +/- 14 %p	*
MF	8h → 10h	-71 +/- 15 %p	**
MF	8h → 12h	-76 +/- 14 %p	**
MF	8h → 18h	-67 +/- 14 %p	**

## WB (T47D)



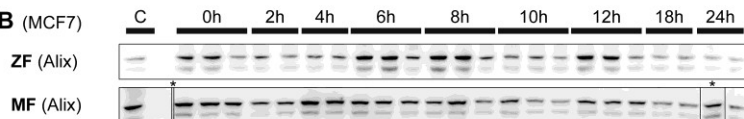
## DG (MCF7)



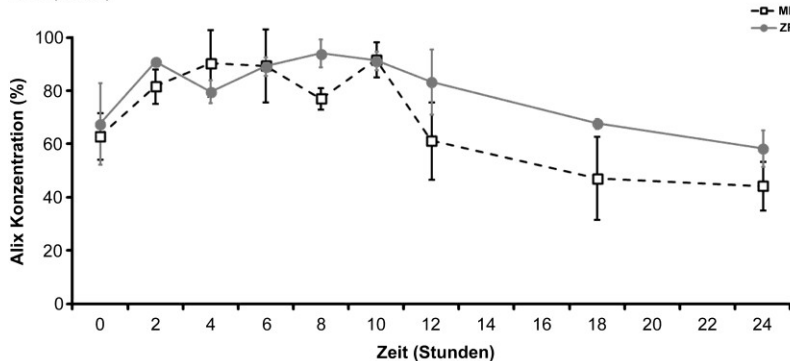
## TB (MCF7)

F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	2h → 6h	+45 +/- 20 %p	*
ZF	4h → 6h	+42 +/- 18 %p	*
ZF	6h → 18h	-55 +/- 19 %p	*
ZF	6h → 24h	-66 +/- 19 %p	*
ZF	8h → 24h	-64 +/- 23 %p	*
MF	2h → 4h	+31 +/- 10 %p	*
MF	4h → 10h	-43 +/- 12 %p	*
MF	4h → 18h	-44 +/- 8 %p	*

## WB (MCF7)



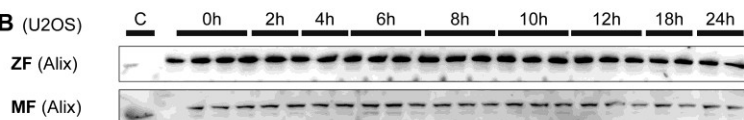
## DG (U2OS)



## TB (U2OS)

F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	2h → 24h	-33 +/- 7 %p	*
ZF	6h → 24h	-31 +/- 8 %p	*
ZF	8h → 24h	-36 +/- 9 %p	*
ZF	10h → 24h	-33 +/- 8 %p	*
MF	4h → 18h	-43 +/- 20 %p	*
MF	4h → 24h	-46 +/- 16 %p	*
MF	6h → 18h	-42 +/- 21 %p	*
MF	6h → 24h	-45 +/- 16 %p	*
MF	10h → 18h	-45 +/- 17 %p	*
MF	10h → 24h	-48 +/- 11 %p	**

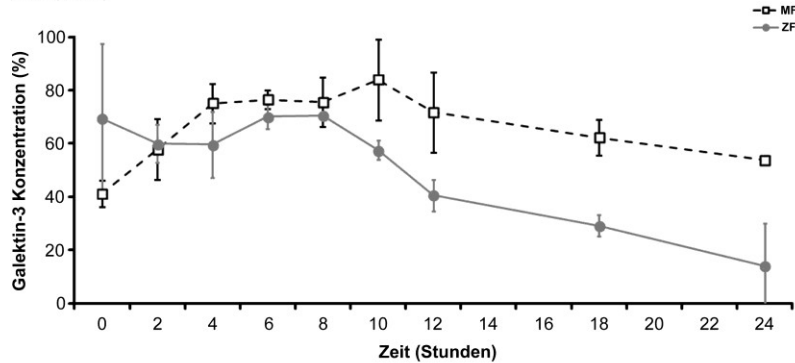
## WB (U2OS)





## B (Galektin-3)

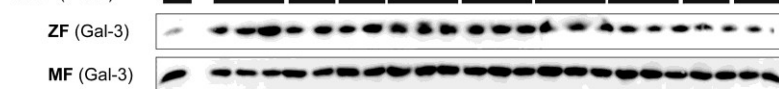
### DG (T47D)



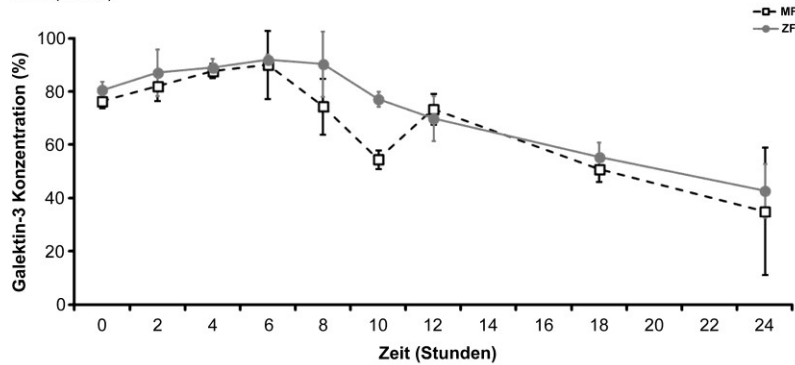
### TB (T47D)

F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	0h → 24h	-55 +/- 32 %p	*
ZF	6h → 24h	-56 +/- 17 %p	**
ZF	8h → 24h	-56 +/- 16 %p	**
MF	0h → 6h	+35 +/- 6 %p	*
MF	0h → 8h	+34 +/- 11 %p	*
MF	0h → 10h	+43 +/- 16 %p	**
MF	6h → 24h	-23 +/- 4 %p	

### WB (T47D)



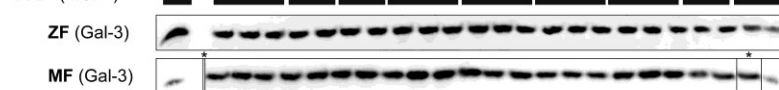
### DG (MCF7)



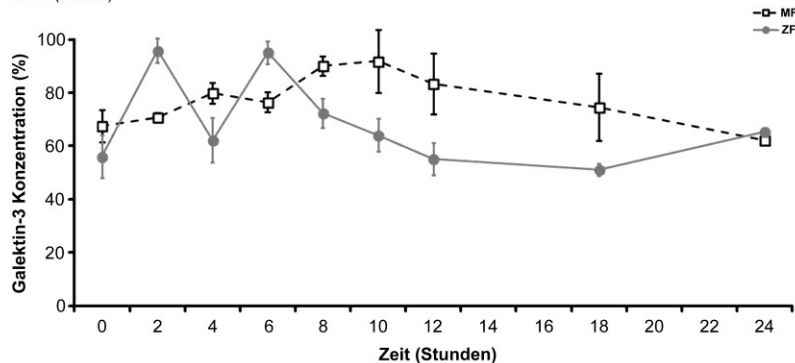
### TB (MCF7)

F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	0h → 24h	-38 +/- 11 %p	**
ZF	2h → 18h	-32 +/- 10 %p	*
ZF	2h → 24h	-44 +/- 13 %p	***
ZF	4h → 18h	-34 +/- 6 %p	*
ZF	4h → 24h	-46 +/- 11 %p	***
ZF	6h → 18h	-37 +/- 6 %p	**
ZF	6h → 24h	-49 +/- 10 %p	***
ZF	8h → 18h	-35 +/- 13 %p	**
ZF	8h → 24h	-48 +/- 16 %p	***
ZF	10h → 24h	-34 +/- 10 %p	**
ZF	12h → 24h	-27 +/- 13 %p	*
MF	0h → 24h	-41 +/- 24 %p	*
MF	2h → 24h	-47 +/- 25 %p	**
MF	4h → 24h	-53 +/- 24 %p	**
MF	6h → 10h	-36 +/- 13 %p	*
MF	6h → 18h	-39 +/- 14 %p	*
MF	6h → 24h	-55 +/- 27 %p	***
MF	8h → 24h	-39 +/- 26 %p	*
MF	12h → 24h	-38 +/- 25 %p	*

### WB (MCF7)



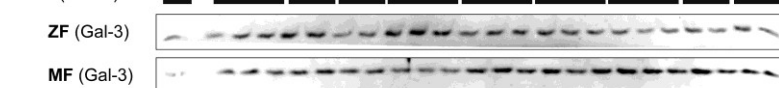
### DG (U2OS)



### TB (U2OS)

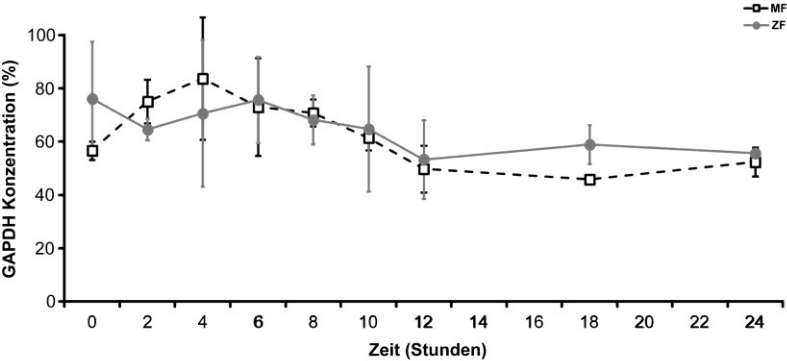
F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	0h → 2h	+40 +/- 9 %p	***
ZF	0h → 6h	+39 +/- 9 %p	***
ZF	2h → 4h	-34 +/- 10 %p	**
ZF	2h → 8h	-24 +/- 7 %p	*
ZF	2h → 10h	-32 +/- 8 %p	**
ZF	2h → 12h	-41 +/- 8 %p	***
ZF	2h → 18h	-45 +/- 5 %p	***
ZF	2h → 24h	-31 +/- 5 %p	**
ZF	4h → 6h	+33 +/- 9 %p	***
ZF	6h → 8h	-23 +/- 7 %p	*
ZF	6h → 10h	-31 +/- 8 %p	***
ZF	6h → 12h	-40 +/- 7 %p	***
ZF	6h → 18h	-44 +/- 5 %p	***
ZF	6h → 24h	+30 +/- 8 %p	**
ZF	8h → 18h	-21 +/- 6 %p	*
MF	0h → 8h	+23 +/- 7 %p	*
MF	8h → 24h	-28 +/- 4 %p	*

### WB (U2OS)



C (GAPDH)

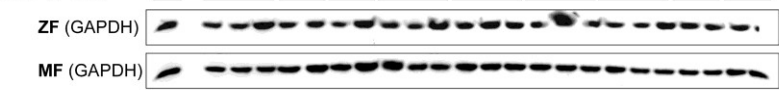
DG (T47D)



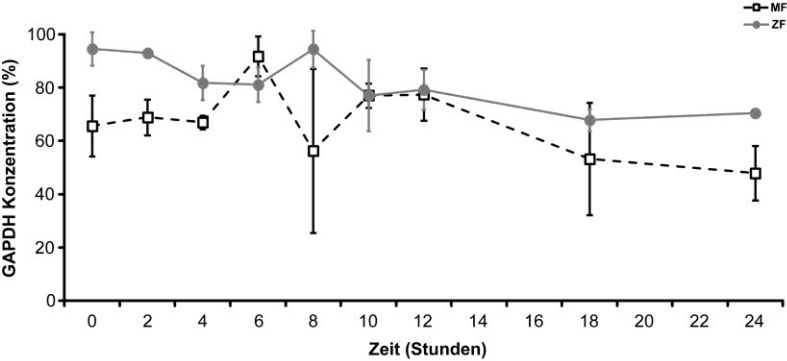
TB (T47D)

F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	NS	NS	NS
MF	NS	NS	NS

WB (T47D)



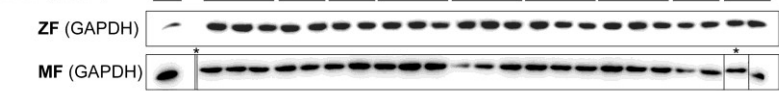
DG (MCF7)



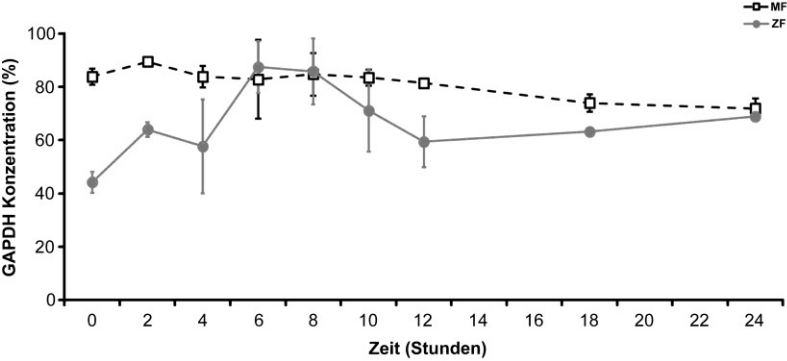
TB (MCF7)

F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	0h → 18h	-27 +/- 8 %p	*
ZF	0h → 24h	-24 +/- 6 %p	*
MF	4h → 6h	+25 +/- 8 %p	*
MF	6h → 24h	-44 +/- 13 %p	**

WB (MCF7)



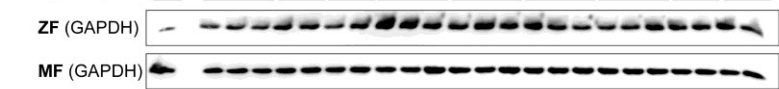
DG (U2OS)

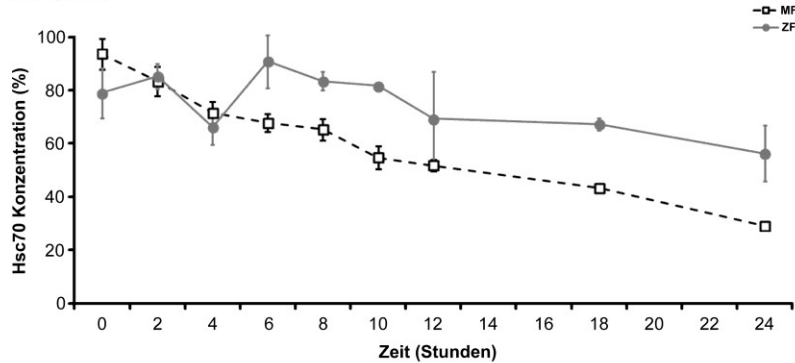
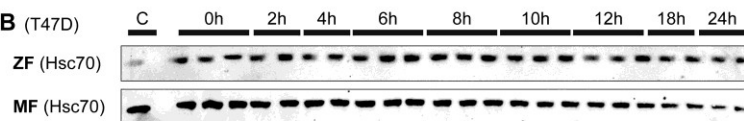
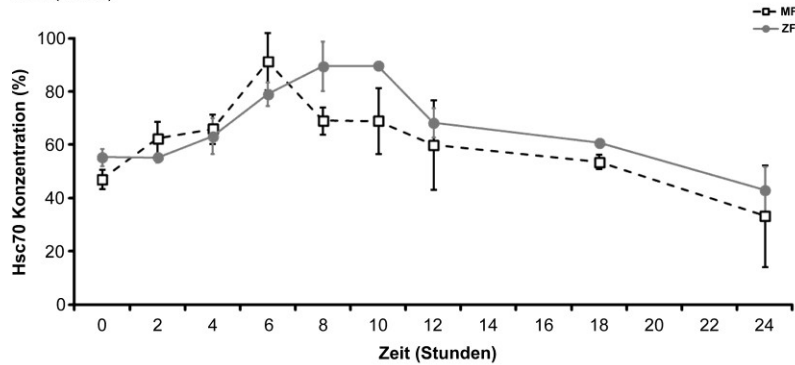
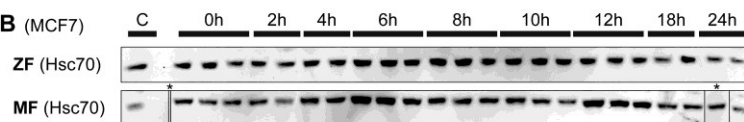
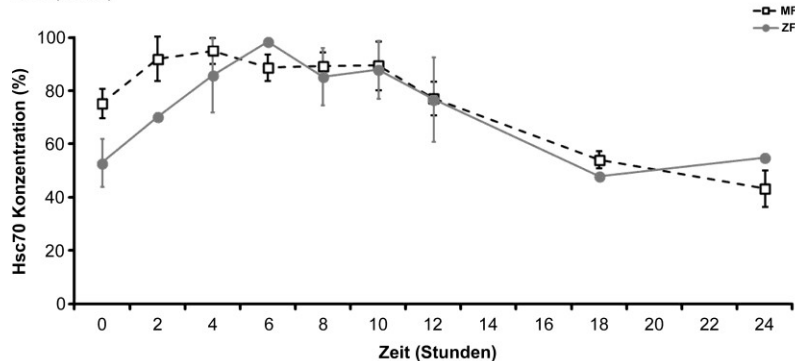
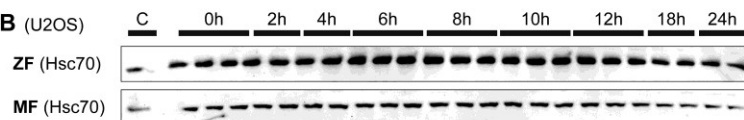


TB (U2OS)

F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	0h → 6h	+43 +/- 11 %p	**
ZF	0h → 8h	+42 +/- 13 %p	**
ZF	0h → 24h	+25 +/- 8 %p	*
ZF	6h → 18h	-24 +/- 10 %p	*
MF	NS	NS	NS

WB (U2OS)



**D** (Hsc70)**DG** (T47D)**WB** (T47D)**DG** (MCF7)**WB** (MCF7)**DG** (U2OS)**WB** (U2OS)**TB** (T47D)

F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	6h → 24h	-35 +/- 14 %p	*
MF	0h → 6h	-26 +/- 7 %p	***
MF	0h → 8h	-28 +/- 7 %p	***
MF	0h → 10h	-39 +/- 7 %p	***
MF	0h → 12h	-42 +/- 6 %p	***
MF	0h → 18h	-50 +/- 6 %p	***
MF	0h → 24h	-65 +/- 6 %p	***
MF	2h → 6h	-16 +/- 7 %p	*
MF	2h → 8h	-18 +/- 7 %p	**
MF	2h → 10h	-29 +/- 7 %p	***
MF	2h → 12h	-32 +/- 6 %p	***
MF	2h → 18h	-40 +/- 6 %p	***
MF	2h → 24h	-54 +/- 6 %p	***
MF	4h → 10h	-17 +/- 6 %p	*
MF	4h → 12h	-20 +/- 5 %p	**
MF	4h → 18h	-28 +/- 4 %p	***
MF	4h → 24h	-42 +/- 4 %p	***
MF	6h → 10h	-13 +/- 6 %p	*
MF	6h → 12h	-16 +/- 4 %p	**
MF	6h → 18h	-24 +/- 4 %p	***
MF	6h → 24h	-39 +/- 3 %p	***
MF	8h → 12h	-14 +/- 5 %p	*
MF	8h → 18h	-22 +/- 4 %p	**
MF	8h → 24h	-36 +/- 4 %p	***
MF	10h → 24h	-26 +/- 4 %p	***
MF	12h → 24h	-23 +/- 2 %p	***

**TB** (MCF7)

F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	0h → 6h	+24 +/- 5 %p	**
ZF	0h → 8h	+34 +/- 10 %p	***
ZF	0h → 10h	+34 +/- 4 %p	***
ZF	2h → 6h	+24 +/- 5 %p	*
ZF	2h → 8h	+35 +/- 9 %p	***
ZF	2h → 10h	+35 +/- 2 %p	***
ZF	4h → 8h	+26 +/- 11 %p	**
ZF	4h → 10h	+26 +/- 7 %p	**
ZF	6h → 24h	-36 +/- 10 %p	***
ZF	8h → 12h	-21 +/- 11 %p	*
ZF	8h → 18h	-29 +/- 9 %p	**
ZF	8h → 24h	-47 +/- 13 %p	***
ZF	10h → 12h	-21 +/- 6 %p	*
ZF	10h → 18h	-29 +/- 1 %p	**
ZF	10h → 24h	-47 +/- 9 %p	***
ZF	12h → 24h	-25 +/- 10 %p	**
MF	0h → 6h	+44 +/- 11 %p	**
MF	6h → 24h	-58 +/- 22 %p	**

**TB** (U2OS)

F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	0h → 6h	+45 +/- 9 %p	**
ZF	0h → 8h	+32 +/- 14 %p	*
ZF	0h → 10h	+35 +/- 14 %p	*
ZF	6h → 18h	-50 +/- 2 %p	**
ZF	6h → 24h	-44 +/- 1 %p	**
ZF	8h → 18h	-37 +/- 11 %p	*
ZF	10h → 18h	-33 +/- 11 %p	*
MF	0h → 6h	+17 +/- 7 %p	*
MF	0h → 24h	-32 +/- 9 %p	**
MF	2h → 18h	-38 +/- 9 %p	**
MF	2h → 24h	-49 +/- 11 %p	***
MF	4h → 18h	-41 +/- 6 %p	***
MF	4h → 24h	-52 +/- 8 %p	***
MF	6h → 18h	-35 +/- 6 %p	**
MF	6h → 24h	-49 +/- 8 %p	***
MF	8h → 18h	-35 +/- 6 %p	**
MF	8h → 24h	-46 +/- 9 %p	***
MF	10h → 18h	-35 +/- 10 %p	***
MF	10h → 24h	-46 +/- 11 %p	***
MF	12h → 18h	-23 +/- 7 %p	*
MF	12h → 24h	-34 +/- 9 %p	**

**Abbildung 4.4: Durch einen Hitzeschock wird die Expression von Alix, Galektin-3 und Hsc70 bei allen drei Zelllinien, die von GAPDH nur bei MCF7- und U2OS-Zellen beeinflusst.** Proben ungestresster (Null Stunden) und gestresster Zellen (44 °C, 25 Minuten) nach unterschiedlichen Erholungsperioden (37 °C, zwei bis 24 Stunden) wurden homogenisiert und durch differentielle Zentrifugation in zellkernfreie Zytosolfractionen (ZF; durchgehende graue Linien und Kreise) und Membranfraktionen (MF; gestrichelte schwarze Linien und Vierecke) getrennt. Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Polyvinylidenfluorid-Membranen übertragen und die Zielproteine Alix (**A**), Galektin-3 (**B**), GAPDH (**C**) und Hsc70 (**D**) sequentiell immunologisch markiert beziehungsweise detektiert. Um die resultierenden Bandenintensitätswerte der einzelnen Westernblots miteinander vergleichen zu können, wurden jeweils die Intensitäten aller Banden eines Blots densitometrisch quantifiziert, die Bande mit der höchsten Intensität als 100 % definiert und die relativen Werte der anderen Banden des Blots basierend auf dieser Definition errechnet. Danach wurden die Daten einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen und nach Bonferroni korrigiert, um statistisch signifikante Werte sowie die sich aus diesen ergebenden Differenzen auch bei geringen Intensitätsunterschieden identifizieren zu können. Die Diagramme (DG) zeigen die Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung (Mittelwerte +/- Standardabweichungen;  $n \leq 3$ ) der Westernblots (WB). Die Tabellen (TB) zeigen die sich innerhalb der angegebenen Zeiträumen ergebenden Differenzen statistisch signifikanter Konzentrationsänderungen (\* =  $P \leq 0,05$ ; \*\* =  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $P \leq 0,001$ ) als Prozentpunkte (%p). Um das zur digitalen Bildgebung genutzten Detektionssystem auf Abbildungsfehler zu prüfen, wurde bei den Membranfraktionen der MCF7-Zelllinie die Position einer Probe variiert, die in der Abbildung zur besseren Übersicht an der korrekten Position dargestellt ist (\*|).

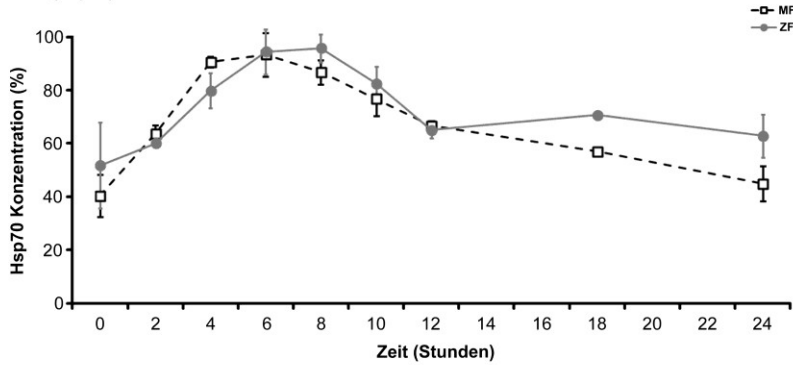
Insgesamt betrachtet musste aus den zuvor für Alix, Galektin-3, GAPDH und Hsc70 beschriebenen Ergebnisse gefolgert werden, dass die jeweiligen Konzentrations- beziehungsweise Expressionsschwankungen tatsächlich aus der Stressexposition resultierten. Dementsprechend war keines der genannten Proteine als interne Referenz für alle drei Zelllinien und jeweils beide Fraktionen nutzbar. Andererseits ergaben sich aber auch keine offensichtlichen Hinweise auf Beeinträchtigungen der Analysen durch vermeidbare methodische Fehler, wie etwa abweichende Gesamtproteinkonzentrationen einzelner Proben oder ungleichmäßig beladene Geltaschen. Im Rahmen weiterer Analysen ließen sich auch für Hsp60 und die Hitzeschockproteine von 90 kDa Molekulargewicht (Hsp90) stressinduzierte Konzentrationsänderungen nachweisen (vergleiche Anhang, Abbildung 9.3). Diese unterschieden sich jedoch bezüglich Verlauf beziehungsweise Ausprägung deutlich von jenen, welche für die nachfolgend beschriebene Hsp70-Stressantwort charakteristisch sind (Abbildung 4.5). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass der gewählte methodische Ansatz auch ohne Nutzung einer internen Referenz Ergebnisse liefern würde, die für eine detaillierte Charakterisierung der Hsp70-Stressantwort ausreichend präzise sind.

#### **4.1.3 Trotz unterschiedlicher Expressionsmaxima ist der zeitliche Verlauf der Hsp70-Stressantwort bei MCF7-, T47D- und U2OS-Tumorzellen vergleichbar**

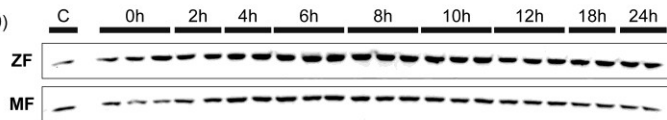
Während bezüglich der stressinduzierten Konzentrations- respektive Expressionsänderungen von Alix, Galektin-3, GAPDH und Hsc70 stets Unterschiede zwischen mindestens zwei der drei Zelllinien beobachtet werden konnten, unterschieden sich im Falle von Hsp70 lediglich die Expressionssteigerungsraten der Tumorzellen (Abbildung 4.5).

## A (T47D)

### DG (Hsp70)



### WB (Hsp70)

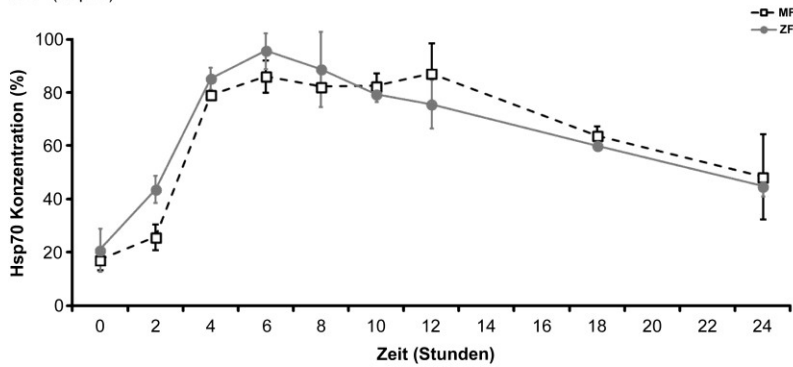


### TB (Hsp70)

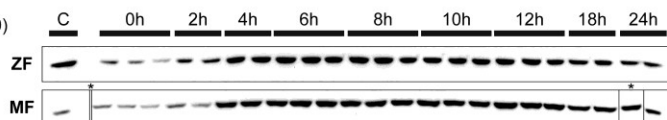
F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	0h → 4h	+28 +/- 17 %p	***
ZF	0h → 6h	+43 +/- 12 %p	***
ZF	6h → 24h	-32 +/- 12 %p	*
MF	0h → 6h	+53 +/- 11 %p	***
MF	0h → 8h	+46 +/- 9 %p	***
MF	0h → 10h	+36 +/- 10 %p	***
MF	4h → 24h	-46 +/- 7 %p	***
MF	6h → 18h	-36 +/- 8 %p	***
MF	6h → 24h	-48 +/- 11 %p	***
MF	8h → 24h	-42 +/- 8 %p	***
MF	10h → 24h	-32 +/- 9 %p	***

## B (MCF7)

### DG (Hsp70)



### WB (Hsp70)

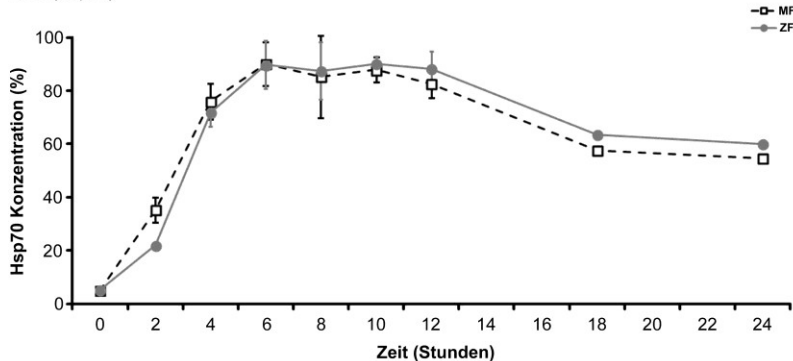


### TB (Hsp70)

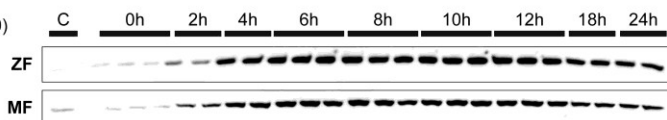
F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	0h → 4h	+64 +/- 9 %p	***
ZF	0h → 6h	+75 +/- 10 %p	***
ZF	0h → 8h	+68 +/- 16 %p	***
ZF	0h → 10h	+59 +/- 9 %p	***
ZF	0h → 12h	+55 +/- 12 %p	***
ZF	2h → 6h	+52 +/- 8 %p	***
ZF	2h → 8h	+45 +/- 15 %p	***
ZF	6h → 24h	-51 +/- 8 %p	***
ZF	8h → 24h	-44 +/- 15 %p	***
MF	0h → 6h	+69 +/- 7 %p	***
MF	0h → 8h	+65 +/- 4 %p	***
MF	0h → 10h	+65 +/- 6 %p	***
MF	0h → 12h	+70 +/- 12 %p	***
MF	0h → 18h	+47 +/- 5 %p	***
MF	2h → 4h	+53 +/- 5 %p	***
MF	2h → 6h	+60 +/- 8 %p	***
MF	2h → 8h	+56 +/- 5 %p	***
MF	2h → 10h	+57 +/- 7 %p	***
MF	2h → 12h	+61 +/- 12 %p	***
MF	2h → 18h	+38 +/- 6 %p	***
MF	6h → 24h	-38 +/- 17 %p	**

## C (U2OS)

### DG (Hsp70)



### WB (Hsp70)



### TB (Hsp70)

F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	0h → 6h	+85 +/- 9 %p	***
ZF	0h → 12h	+83 +/- 7 %p	***
ZF	0h → 18h	+58 +/- 1 %p	***
ZF	0h → 24h	+55 +/- 1 %p	***
ZF	2h → 4h	+50 +/- 5 %p	***
ZF	2h → 6h	+68 +/- 9 %p	***
ZF	2h → 8h	+65 +/- 11 %p	***
ZF	2h → 10h	+68 +/- 3 %p	***
ZF	2h → 12h	+66 +/- 7 %p	***
ZF	2h → 18h	+42 +/- 1 %p	***
ZF	2h → 24h	+38 +/- 1 %p	***
ZF	6h → 24h	-30 +/- 9 %p	**
MF	0h → 4h	+71 +/- 7 %p	***
MF	0h → 6h	+85 +/- 8 %p	***
MF	0h → 8h	+80 +/- 15 %p	***
MF	0h → 10h	+83 +/- 5 %p	***
MF	0h → 12h	+78 +/- 5 %p	***
MF	0h → 18h	+53 +/- 1 %p	***
MF	0h → 24h	+50 +/- 1 %p	***
MF	2h → 6h	+55 +/- 9 %p	***
MF	2h → 8h	+50 +/- 16 %p	***
MF	2h → 10h	+53 +/- 7 %p	***
MF	6h → 24h	-35 +/- 8 %p	**

**Abbildung 4.5: Stressinduziert akkumuliert Hsp70 zeitgleich in den Zytosol- und Membranfraktionen aller analysierten Zelllinien, jedoch mit für die jeweilige Zelllinie charakteristischen Steigerungsraten.** Proben ungestresster und gestresster T47D- (A), MCF7- (B) und U2OS-Zellen (C) nach unterschiedlichen Erholungsperioden (zwei bis 24 Stunden) wurden wie zuvor beschrieben fraktioniert und mittels Gelelektrophorese, Westernblot sowie densitometrischer Quantifizierung analysiert. Die Bandenintensitäten jedes Blots wurden auf die Bande der höchsten Intensität normalisiert, die resultierenden Werte zwecks Identifizierung signifikanter Konzentrationsschwankungen einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen und nach Bonferroni korrigiert. Die Diagramme (DG) zeigen die Ergebnisse der Quantifizierung (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen;  $n \leq 3$ ) der Westernblots (WB). Die Tabellen (TB) zeigen die sich innerhalb der jeweiligen Zeiträume ergebenden statistisch signifikanten Konzentrationsänderungen (\* =  $P \leq 0,05$ ; \*\* =  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $P \leq 0,001$ ) als Prozentpunkte (%p). Die Position einer Probe der MCF7-Membranfraktionen wurde ursprünglich variiert, diese ist in der Abbildung an korrekter Position dargestellt (\*|).

Bei den T47D-Zellen (Abbildung 4.5 A) stieg die Hsp70-Konzentration bis sechs Stunden nach dem Hitzeschock in den Zytosolfraktionen um  $83 \pm 23$  % und in den Membranfraktionen um  $132 \pm 28$  %, entsprechend einer Verdopplung der Expression. Ab etwa zehn Stunden begannen die Hsp70-Konzentrationen in beiden Fraktionen wieder zu sinken und erreichten bis 24 Stunden wieder die entsprechenden Nullstundenwerte. Die MCF7-Zellen (Abbildung 4.5 B) erreichten das Hsp70-Expressionsmaximum zwar ebenfalls nach sechs Stunden, allerdings stieg die Konzentration in den Zytosolfraktionen um  $358 \pm 50$  % und in den Membranfraktionen um  $402 \pm 42$  %, entsprechend einer Verfünffachung der Expression. Außerdem fielen die Konzentrationen nach zwölf Stunden nicht wieder auf Niveaus, welche jenen der ungestressten Zellen entsprachen. Vielmehr lagen die Konzentrationen nach 24 Stunden in den Zytosolfraktionen noch um  $115 \pm 20$  % und in den Membranfraktionen um  $182 \pm 34$  % über den entsprechenden Ausgangswerten.

Die weitaus stärkste Hsp70-Stressantwort zeigten jedoch die U2OS-Osteosarkom-Zellen (Abbildung 4.5 C): Sechs Stunden nach dem Hitzeschock lag die Hsp70-Konzentration in den U2OS-Zytosolfraktionen um  $1624 \pm 174$  % und in den U2OS-Membranfraktionen um  $1709 \pm 164$  % über den entsprechenden Nullstundenwerten. Ab etwa zwölf Stunden begannen die Konzentrationen wieder langsam zu sinken, lagen nach 24 Stunden aber noch immer um etwa 1000 % über den Niveaus der ungestressten Zellen.

Insgesamt betrachtet ließ sich somit feststellen, dass die drei Tumorzelllinien zwar unterschiedliche basale Hsp70-Expressionsniveaus und verschiedene Intensitäten der Hsp70-Stressantworten aufwiesen. Darüber hinaus teilten sie aber auch interessante Gemeinsamkeiten: Zum einen konnten bei keiner Zelllinie signifikante Unterschiede zwischen den Zytosol- und den Membranfraktionen nachgewiesen werden. Die Schwankungen der Hsp70-Konzentrationen verliefen in beiden Fraktionen stets vergleichbar. Zum anderen war der Verlauf der Hsp70-Stressantwort bei allen drei Zelllinien ähnlich: Die Hsp70-Konzentrationen stiegen unmittelbar nach Stressexposition stark an und erreichten zwi-

schen vier und sechs Stunden nach Stresseinwirkung die jeweiligen Maxima. Danach blieben die Konzentrationen für einige Stunden stabil und sanken anschließend mit vergleichbaren Reduktionsraten (T47D:  $-43 \pm 12 \%$ ; MCF7:  $-48 \pm 14 \%$ ; U2OS:  $-36 \pm 10 \%$ ).

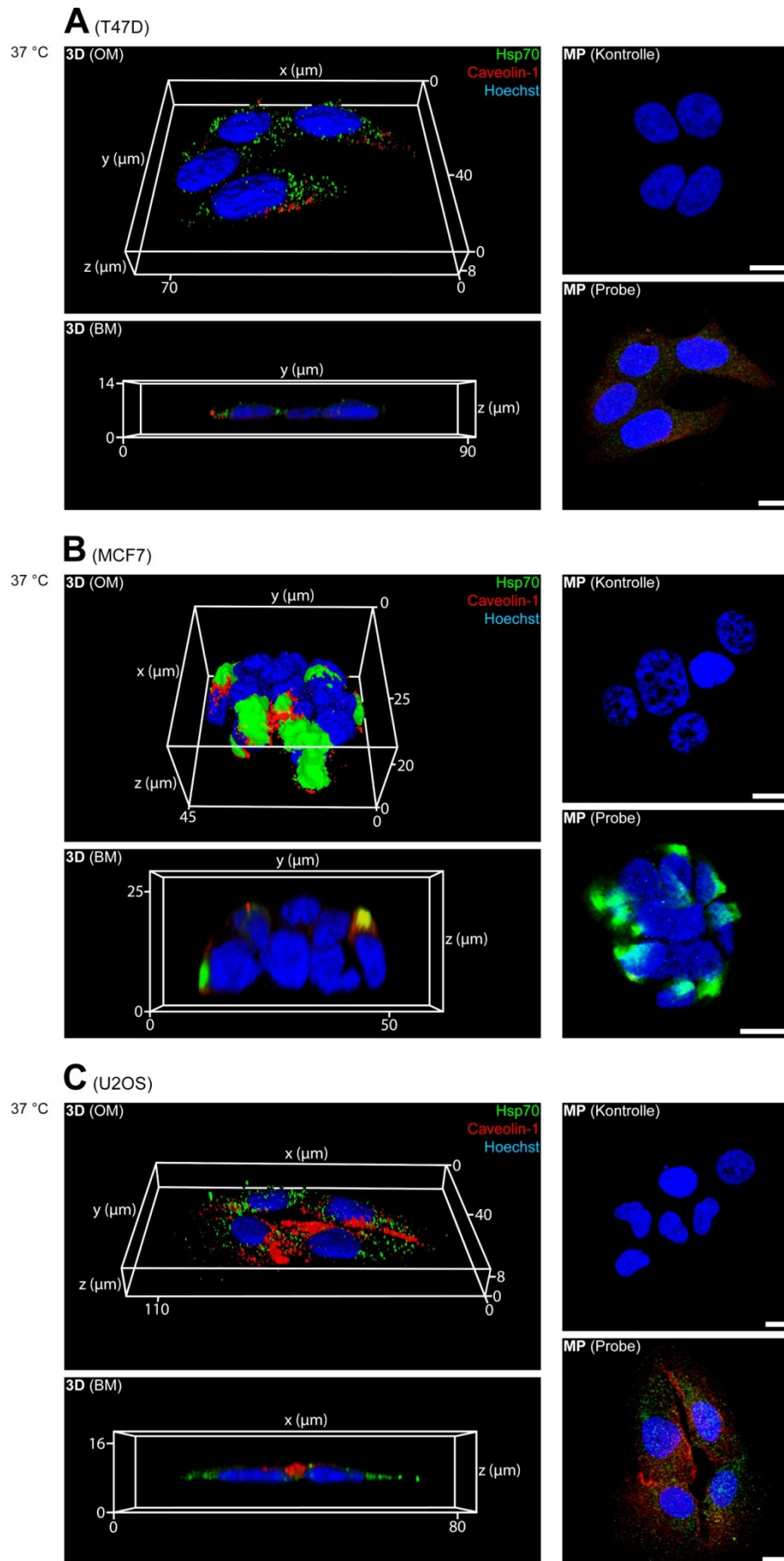
Zusammenfassend erlauben die zuvor beschriebenen Ergebnisse folgende Schlussfolgerungen: (1) Die Expressionssteigerungsraten von GAPDH, Hsc70 und Hsp70 sind abhängig vom basalen Hsp70-Expressionsniveau. Je mehr Hsp70 eine Zelle unter physiologischen Bedingungen exprimiert, desto schwächer ist die Stressreaktion. (2) Der zeitliche Verlauf der Hsp70-Stressantwort ist unabhängig vom basalen Expressionsniveau. (3) Die Hsp70-Expressionsreduktionsrate (beziehungsweise die bei Abklingen der Stressreaktion innerhalb eines gewissen Zeitraums wiederverwertete oder exportierte Hsp70-Menge) ist unabhängig von Expressionssteigerungsrate und basalem Expressionsniveau.

## **4.2 Tumorzellen konzentrieren Hsp70 und andere Proteine auf den extrazellulären Plasmamembranseiten auf vesikulären Strukturen**

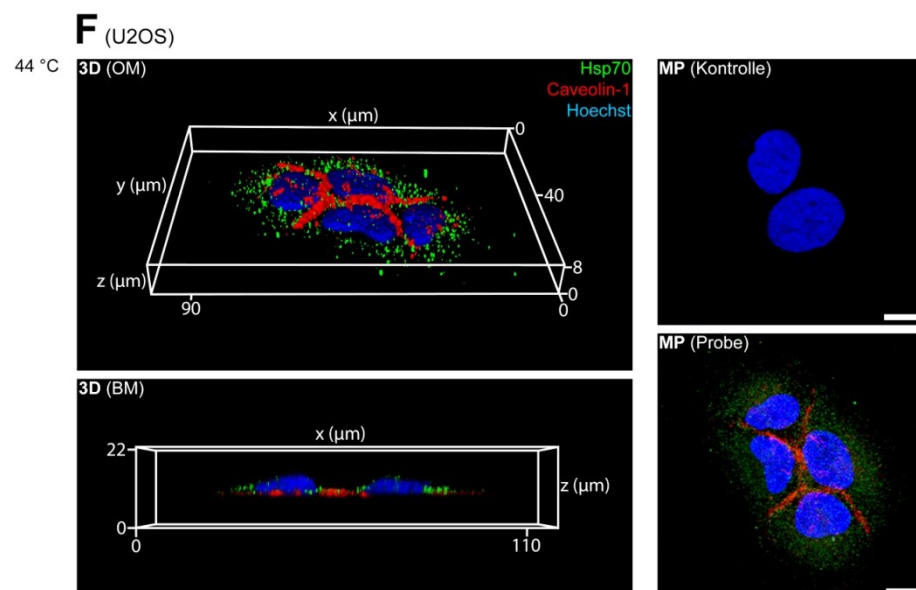
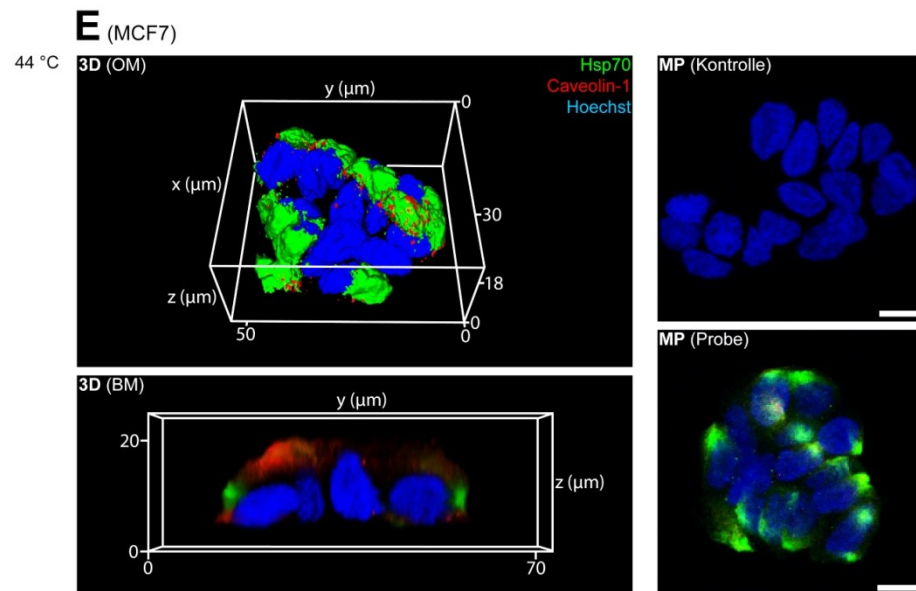
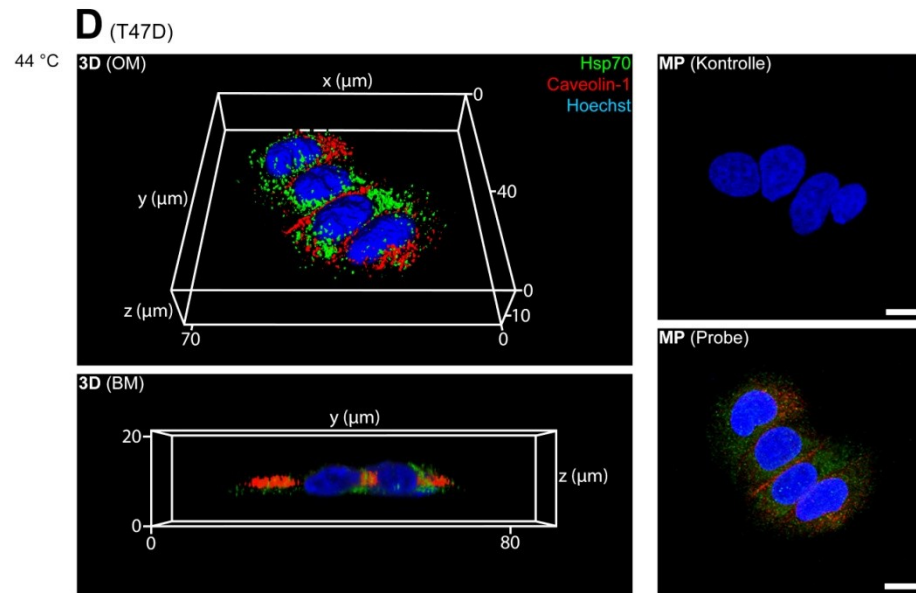
Um die Hsp70-Lokalisationsmuster der Tumorzelllinien detailliert zu charakterisieren und um zu prüfen, inwieweit sich thermischer Stress auf diese auswirkt, wurden die T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen entweder durchgängig bei 37 °C kultiviert oder zunächst einem nichtletalen Hitzeschock ausgesetzt (44 °C, 25 Minuten) und anschließend für eine Erholungsphase von acht Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert, wenn erforderlich permeabilisiert und unspezifische Bindestellen blockiert. Nach Markierung der Zielproteine mittels entsprechender Primär- sowie Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper und der Desoxyribonukleinsäuren (DNS) mit Hoechst 33342 wurden die Präparate mittels konfokaler Laser-Scanning- sowie klassischer Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

### **4.2.1 Integrales und peripheres Hsp70 sind auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran von T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen in Clustern lokalisiert**

Bereits eigene vorbereitende Experimente (vergleiche Anhang, Abbildung 9.4) wie auch Publikationen anderer Arbeitsgruppen (vergleiche beispielsweise Stangl *et al.*, 2011; Kovalenko *et al.*, 2012; Gehrmann *et al.*, 2014) ließen vermuten, dass Hsp70 auf den extrazellulären Seiten der Plasmamembranen von Tumorzellen nicht gleichmäßig verteilt vorliegt. Vielmehr scheint Hsp70 in räumlich begrenzten Bereichen zu akkumuliert. Daher wurden konfokale Bildstapel unpermeabilisierter, ungestresster sowie gestresster T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen entlang der Z-Achse aufgenommen. Aus diesen Z-Bildstapeln wurden Maximalprojektionen und 3D-Rekonstruktionen der Zellen generiert, um die Lokalisation von Hsp70 und anderen Proteinen auf den Zelloberflächen zu visualisieren.



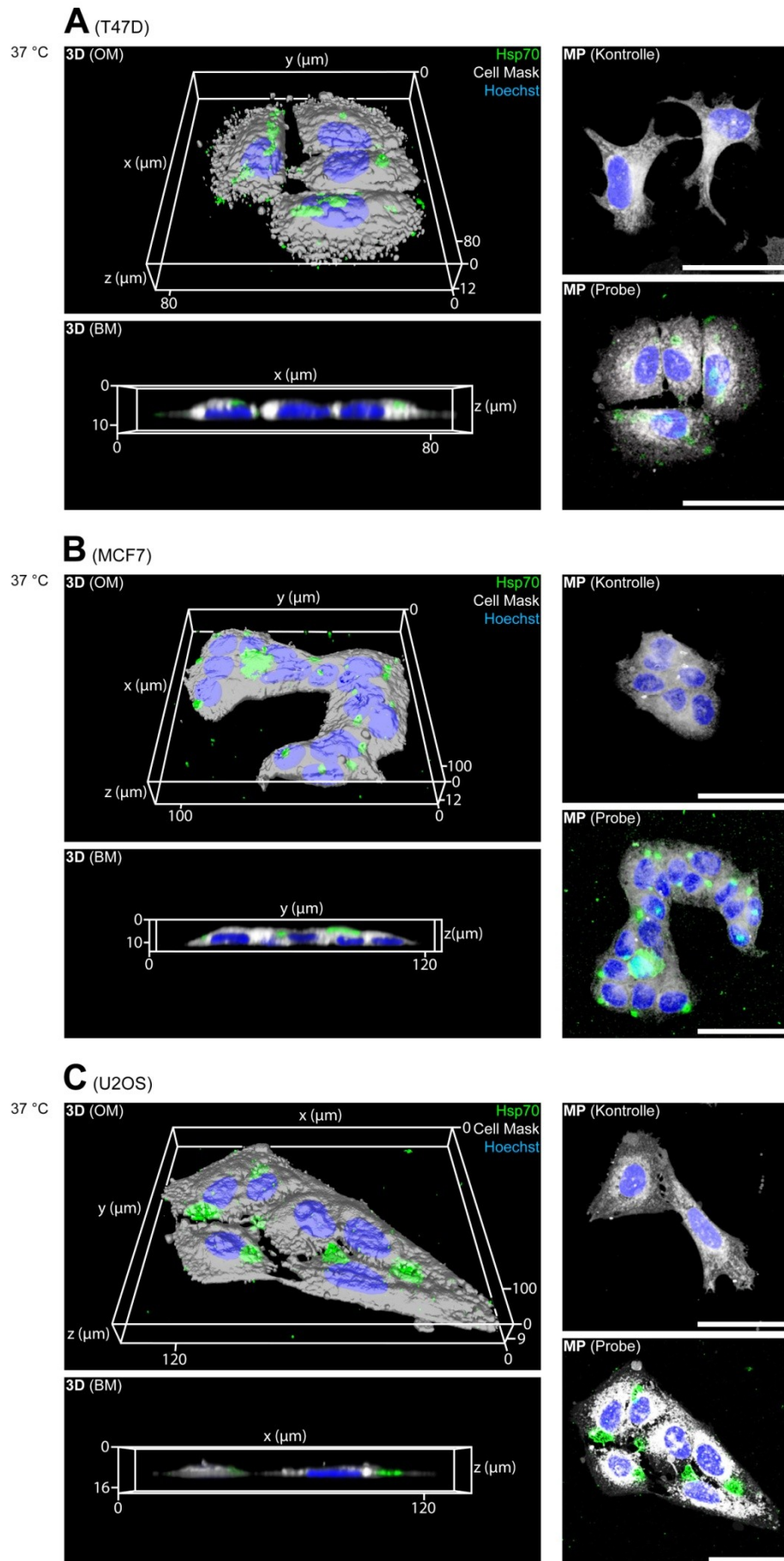


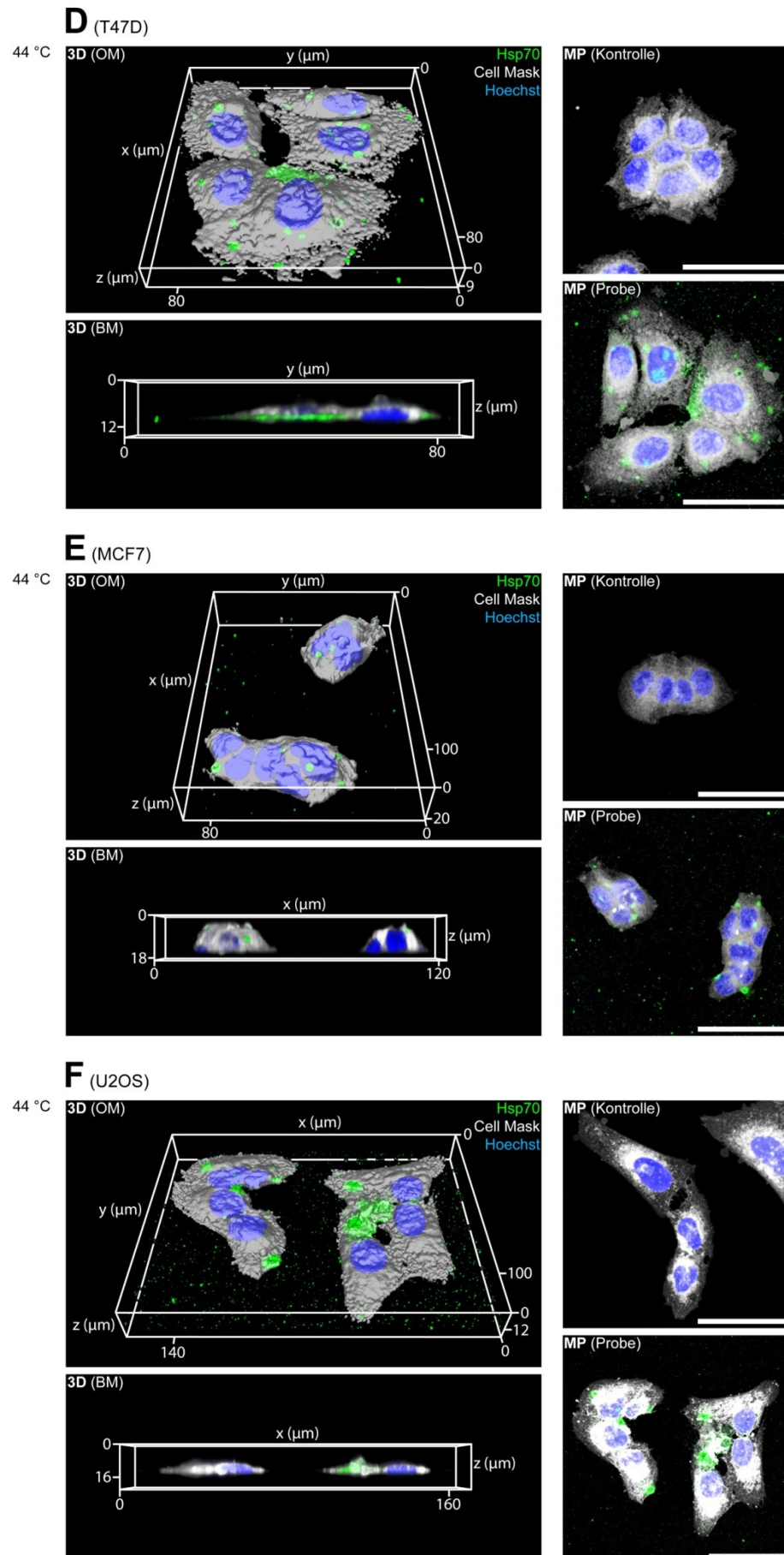


**Abbildung 4.6: T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen exponieren Hsp70 und Caveolin-1 auf der extraplastischen Seite der Zellmembran. Nach Stressexposition ändert sich die Verteilung dieser Proteine nicht.** Ungestresste (37 °C) und gestresste (44 °C, 25 Minuten; acht Stunden Erholungszeit bei 37 °C) T47D- (A, D), MCF7- (B, E) und U2OS-Zellen (C, F) wurden ohne Permeabilisierung für die Fluoreszenzmarkierung vorbereitet. Die Zielproteine Hsp70 (grün) und Caveolin-1 (rot) wurden indirekt immunfluoreszenzmarkiert, wobei für Hsp70 der monoklonale (Primär-) Antikörper sc-59569 genutzt wurde. Die Markierung der DNS erfolgte mit Hoechst 33342 (blau). Z-Bilderstapel repräsentativer Zellen wurden mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (Leica TCS SP2, 40-fach Ölimmersionsobjektiv) aufgenommen und aus diesen Maximalprojektionen (MP) sowie 3D-Rekonstruktionen (3D) im Oberflächenmodus (OM) und horizontale Querschnitte im Überblendungsmodus (BM) generiert. Um die Abbildungen der ungestressten direkt mit denen der gestressten Zellen vergleichen zu können (Probe), wurden alle Mikroskop- beziehungsweise Softwareeinstellungen zunächst zur Darstellung der Zielproteine auf den gestressten Zellen optimiert. Nach Abstimmung auf Präparate, bei deren Herstellung keine Primärantikörper verwendet worden waren (Kontrolle), wurden dieselben Einstellungen für die Analyse der ungestressten Zellen genutzt. Maßstab: 10 µm.

Zunächst wurden Zellen analysiert, die nach dem Aussäen und vor Beginn des Experiments für nur 36 Stunden unter physiologischen Bedingungen kultiviert worden waren, da dies der Vorgehensweise bei der vorangegangenen biochemischen Analyse entsprach. Hierbei wurde Hsp70 mittels des monoklonalen Antikörpers sc-59569 indirekt immunfluoreszenzmarkiert. Wie Abbildung 4.6 zeigt, ließen sich bei Verwendung dieses Antikörpers auf den unpermeabilisierten MCF7-Zellen starke Fluoreszenzsignale detektieren. Auf den T47D- und U2OS-Zellen hingegen waren nur schwache Signale erfassbar. Interessanterweise waren die Hsp70-Signale auf den MCF7-Zellen auf wenige, eng begrenzte Bereiche konzentriert (Abbildung 4.6 B, E), auf den T47D- und U2OS-Zellen aber gleichmäßig verteilt (Abbildung 4.6 A, C, D, F). Nach Stressexposition stiegen die Hsp70-Signalsintensitäten nicht signifikant, die Lokalisationsmuster blieben weitgehend konstant.

Aufgrund der von Gehrmann *et al.* publizierten Ergebnisse durchflusszytometrischer Analysen, welche den MCF7-Zellen einen im Vergleich zu den T47D-Zellen höheren Gehalt von integralem Hsp70 bescheinigen (Gehrmann *et al.*, 2014), entsprachen diese Ergebnisse grundsätzlich den Erwartungen. Allerdings deuteten die Resultate weiterführender Experimente darauf hin, dass die gleichmäßige Verteilung der Hsp70-Signale auf den T47D- und U2OS-Zellen darauf zurückzuführen sein könnte, dass diese Zellen 36 Stunden nach der Aussaat gerade erst mit der Bildung von Hsp70-Clustern begonnen hatten (vergleiche Anhang, Abbildung 9.4). Daher wurden in einem weiteren Versuchsansatz Zellen analysiert, die vor Beginn des Experiments zunächst für 72 Stunden unter physiologischen Bedingungen inkubiert worden waren. Um die Visualisierung von Hsp70 zu vereinfachen, kam hierbei der polyklonale Hsp70-Antikörper sc-1060 zum Einsatz. Darüber hinaus wurde ein fluoreszierender Membranfarbstoff genutzt, um die intrazellulären Membranen sowie die Plasmamembranen zu markieren und so die Position sowie die Anzahl der Hsp70-Cluster relativ zur Oberfläche der Zellen darstellen zu können (Abbildung 4.7).





**Abbildung 4.7: Auf den Oberflächen ungestresster und gestresster T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen akkumulieren integrales und peripheres Hsp70 in Clustern.** Ungestresste (37 °C) und gestresste (44 °C, 25 Minuten; acht Stunden Erholungszeit bei 37 °C) T47D- (A, D), MCF7- (B, E) und U2OS-Zellen (C, F) wurden ohne Permeabilisierung für die Fluoreszenzmarkierung vorbereitet. Das Zielprotein Hsp70 (grün) wurden unter Verwendung des polyklonalen (Primär-) Antikörpers sc-1060 indirekt immunfluoreszenzmarkiert. Die Markierung der zellulären Membranen erfolgte mittels eines fluoreszierenden Membranfarbstoffs ("Cell Mask Deep Red Plasma Membrane Stain"; grau), die der DNS mit Hoechst 33342 (blau). Aus Bilderstapeln repräsentativer Zellen, aufgenommen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica TCS SP2, 40-fach Ölimmersionsobjektiv), wurden Maximalprojektionen (MP) sowie 3D-Rekonstruktionen (3D) ganzer Zellen im Oberflächenmodus (OM) und horizontale Querschnitte im Überblendungsmodus (BM) generiert. Um die Abbildungen ungestresster und gestresster Zellen (Probe) direkt miteinander vergleichen zu können, wurden alle Mikroskop- beziehungsweise Softwareeinstellungen zunächst zur Visualisierung des Zielproteins auf den gestressten Zellen optimiert. Nach Abstimmung auf die entsprechenden Negativkontrollen (Kontrolle) erfolgte die Analyse der ungestressten Zellen mit denselben Einstellungen. Maßstab: 50 µm.

Wie Abbildung 4.7 zeigt, waren bei Verwendung des polyklonalen Hsp70-Antikörpers sc-1060 nicht nur auf den MCF7-Zellen, sondern auch auf den T47D- und U2OS-Zellen Hsp70-Signale hoher Intensität detektierbar. Diese waren grundsätzlich auf eng begrenzte Bereiche von zumeist sphärischer oder globulärer Erscheinung konzentriert und traten nur apikal oder lateral auf (Abbildung 4.7 A, B, C). Diese Lokalisationsmuster und die Intensitäten der Fluoreszenzsignale änderten sich auch nach Stressexposition nicht signifikant (Abbildung 4.7 D, E, F). Interessanterweise gelang es hierbei nicht mehr, die aufgrund des unterschiedlichen Gehalts von integralem Hsp70 zu erwartenden Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien zu visualisieren. Die Hsp70-Signalintensitäten der sphärischen beziehungsweise globulären Strukturen unterschieden sich bereits bei einzelnen Zellen derselben Zelllinie so stark, dass signifikante Abweichungen zu Zellen anderer Zelllinien nicht erkennbar waren (vergleiche Abbildung 4.8 und Anhang, Abbildung 9.6).

Da die Zelllinien T47D und MCF7 bislang nur bezüglich des Gehalts von integralem Hsp70 charakterisiert wurden (Gehrmann *et al.*, 2014), obgleich das Chaperon auch als peripheres Membranprotein vorliegen kann, lag daher die Schlussfolgerung nahe, der polyklonale Hsp70-Antikörper könnte beide Formen des Proteins binden. Dementsprechend ließ sich aus den beschriebenen Ergebnissen folgern, dass die Tumorzellen die Gesamtheit des Membran-gebundenen Hsp70 auf ihren Oberflächen in einem längerfristigen Prozess in Clustern konzentrierten und dass dieser Vorgang durch thermalen Stress kaum beeinflusst wurde. Form und Größe der Cluster ließen weiterhin vermuten, dass es sich um in der Abschnürung begriffene Vesikel handeln könnte (entsprechend der englischen Bezeichnung "*Shedding Vesicles*" nachfolgend als "SVs" bezeichnet). Da die Hsp70-Cluster erst 72 Stunden nach der Aussaat bei allen drei Zelllinien deutlich erkennbar waren, wurden die Tumorzellen vor allen nachfolgend beschriebenen Experimenten für mindestens diesen Zeitraum unter physiologischen Bedingungen kultiviert.

#### **4.2.2 Ein nichtletaler Hitzeschock hat bei T47D-, MCF7- und U2OS-Tumorzellen keine erkennbaren Auswirkungen auf die subzelluläre Lokalisation von Hsp70**

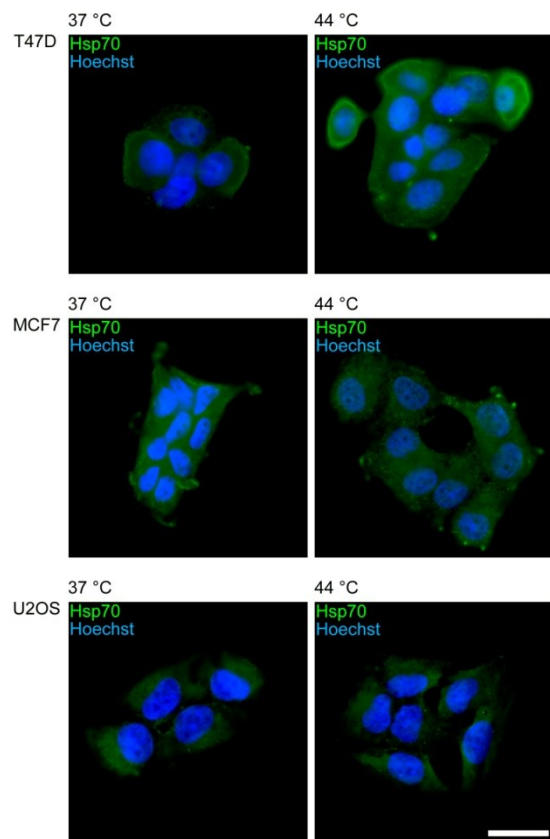
Wie zuvor bereits beschrieben, gelang es mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie nicht, unterschiedliche Hsp70-Signalintensitäten auf den Oberflächen ungestresster und gestresster Zellen nachzuweisen (Abbildungen 4.6 und 4.7). Abgesehen von der ungleichmäßigen Verteilung der Chaperone fiel hierbei auf, dass die Ausdehnung der Zellen entlang der Z-Achse auch innerhalb einer Zelllinie bisweilen stark variierte, weshalb sich deren optimalen Fokusebenen unterschieden. Daher wurde auf klassische Fluoreszenzmikroskopie zurückgegriffen, um die Auflösung entlang der Z-Achse zu vermindern. Hierdurch sollten die aus den unterschiedlichen Zellhöhen resultierenden Schwankungen der Signalintensitäten nivelliert und so die Erfassung etwaige Unterschiede zwischen den Zellpopulationen erleichtert werden. Die Analyse erfolgte wiederum unter Nutzung des polyklonalen Hsp70-Antikörpers sc-1060 und wurde auf permeabilisierte Zellen ausgedehnt, um auch diese auf Auswirkungen der Stressexposition zu prüfen (Abbildung 4.8).

Bezüglich der Hsp70-Lokalisationsmuster auf den unpermeabilisierten Zellen lieferte die klassische Fluoreszenzmikroskopie keine neuen Erkenntnisse (Abbildung 4.8 B). Die meist sphärischen beziehungsweise globulären Hsp70-Cluster waren bei allen drei Zelllinien detektierbar, nach Stressexposition konnten weder signifikante Änderungen der Lokalisationsmuster noch der Intensitäten der Fluoreszenzsignale beobachtet werden. Interessanterweise waren aber zur optimalen Visualisierung der Chaperone bei den MCF7-Zellen längere Belichtungszeiten und höhere Beleuchtungsintensitäten erforderlich als bei den T47D-Zellen (vergleiche Anhang, Legende zu Abbildung 9.6), obwohl die MCF7-Zellen mehr integrales Hsp70 in der Plasmamembran enthalten (Gehrmann *et al.*, 2014). Da bislang keine der Zelllinien bezüglich des Gehalts von peripherem Hsp70 charakterisiert wurde, ließ dies vermuten, dass bei T47D- und U2OS-Zellen ein Großteil des auf den Zelloberflächen exponierten Hsp70 in Form peripherer Membranproteine vorlag.

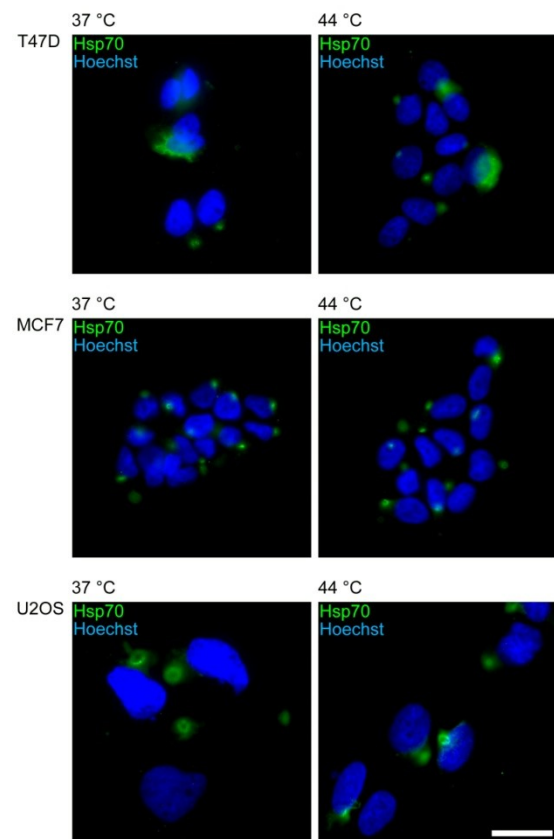
Bei den permeabilisierten Proben fanden sich erstaunlicherweise nur marginale Hinweise auf die Hsp70-Cluster (Abbildung 4.8 A). Vielmehr verteilten sich bei diesen die Fluoreszenzsignale mehr (T47D, MCF7) oder weniger gleichmäßig (U2OS) über Zytoplasma und Zellkerne. Vereinzelt lokale Akkumulationen waren bei T47D- und MCF7-Zellen zwar zu beobachten, im Vergleich zu den Hsp70-Clustern wiesen diese jedoch zumeist geringere Durchmesser auf. Im Falle der T47D-Zellen war darüber hinaus eine geringfügige Verstärkung von Hsp70-Signalen entlang der Zellperipherie erkennbar, dies ließ jedoch lediglich auf unregelmäßige Ein- oder Ausstülpungen der Zellmembran schließen.



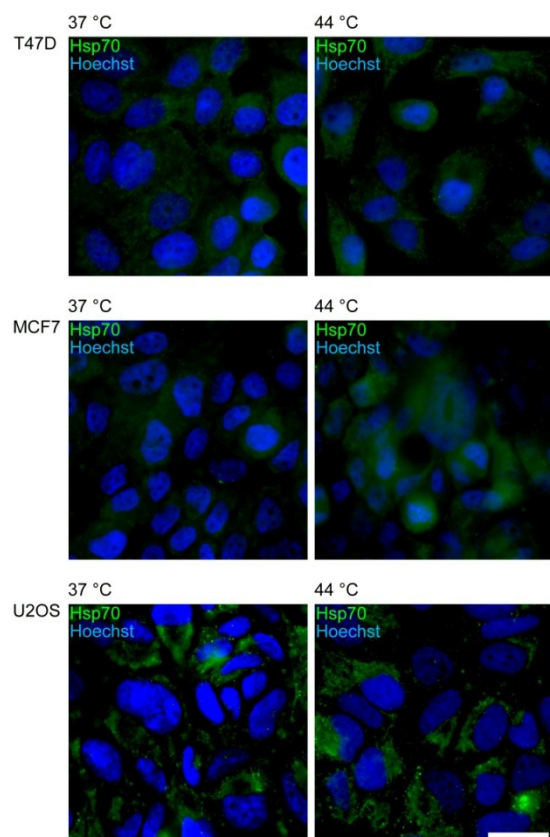
**A** (+Triton)



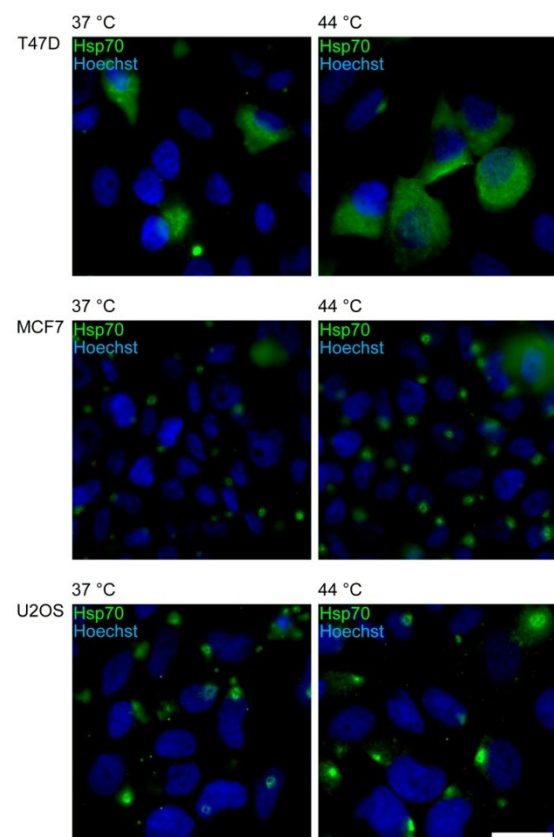
**B** (-Triton)



**C** (+Triton)



**D** (-Triton)



**Abbildung 4.8: Die subzelluläre Lokalisation von Hsp70 wird bei T47D-, MCF7- und U2OS-Tumorzellen durch thermischen Stress nicht erkennbar beeinflusst.** Jeweils  $3,0 \times 10^4$  (A, B) oder  $6,7 \times 10^5$  (C, D) Zellen pro Probe beziehungsweise pro Deckgläschen wurden entweder durchgängig unter physiologischen Bedingungen kultiviert (37 °C) oder zunächst einem Hitzeschock ausgesetzt (44 °C, 25 Minuten) und für acht Stunden Erholungszeit bei 37 °C inkubiert. Danach wurden ungestresste und gestressten Zellen entweder mit (A, C) oder ohne Permeabilisierung (B, D) für die Fluoreszenzmarkierung vorbereitet. Hsp70 wurde unter Verwendung des polyklonalen (Primär-) Antikörpers sc-1060 indirekter immunfluoreszenzmarkiert, die DNS mit Hoechst 33342 gefärbt. Dargestellt sind Überlagerungen der Einzelbilder der für Hsp70 (grün) und DNS (blau) genutzten Detektionskanäle, aufgenommen mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI6000B, 63-fach Ölimmersionsobjektiv). Alle Mikroskop- beziehungsweise Softwareeinstellungen wurden zur Darstellung der Zielproteine in den permeabilisierten, gestressten Zellen optimiert und im Anschluss ohne Änderungen für die unpermeabilisierten Präparate übernommen. Einzelkanalabbildungen und Bilder der jeweiligen Negativkontrollen sind im Anhang enthalten (Abbildung 9.6). Maßstab: 25 µm.

Erneut konnten keine signifikanten Steigerungen der Hsp70-Signalintensitäten nach Stressexposition festgestellt werden. Als mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen dieser Beobachtung (Abbildung 4.8) und den Ergebnissen der biochemischen Analysen (Abbildung 4.5) wurden zunächst die unterschiedlichen Zelldichten in Betracht gezogen, die für die biochemischen und die fluoreszenzmikroskopischen Analysen genutzt worden waren. Daher wurden die fluoreszenzmikroskopischen Analysen mit Proben wiederholt, deren Zelldichte jener entsprach, welche für die biochemischen Analysen genutzt worden war (Abbildung 4.8 C, D). Trotzdem gelang es nicht, den stressinduzierten Anstieg der Hsp70-Expression zu visualisieren oder quantitativ zu erfassen (vergleiche Anhang, Abbildung 9.5). Somit musste davon ausgegangen werden, dass die im Falle von Hsp70 ähnlichen Signalintensitäten der ungestressten und gestressten Zellen nicht auf unterschiedliche Zelldichten, sondern auf die methodischen Einschränkungen zurückzuführen sind, denen die Immunfluoreszenzmikroskopie im Allgemeinen unterworfen ist (Melan und Sluder, 1992). Die Beobachtung, dass sich die Lokalisationsmuster von Hsp70 nach Stressexposition entweder nicht (T47D, MCF7) oder nur sehr geringfügig (U2OS) änderten, ließ hingegen vermuten, dass die subzelluläre Lokalisation der Chaperone durch thermischen Stress der gewählten Intensität und Dauer nicht wesentlich beeinflusst wurde.

#### **4.2.3 T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen exponieren neben Alix und der $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase auch Centrin, GAPDH, LDH und $\alpha$ -Tubulin auf der Zelloberfläche**

Wie die in Abbildung 4.6 dargestellten 3D-Rekonstruktionen und Maximalprojektionen unpermeabilisierter Zellen zeigten, war neben Hsp70 auch Caveolin-1 auf den Zellen detektierbar. Die Caveolin-1-Signale akkumulierten bei allen drei Zelllinien in begrenzten Bereichen, die aber nur auf den MCF7-Zellen mit Hsp70 kolokalisierten. Da Caveolin-1 auf der Zelloberoberfläche mit Phosphatidylserin (PS) kolokalisierend vorliegen soll (Gargalovic und Dory, 2003) und PS bei diversen Tumorzelltypen in der extraplasmatischen



Plasmamembranschicht enthalten ist (Riedl *et al.*, 2011), lag die Vermutung nahe, auch die äußeren Membranschichten der T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen könnten PS enthalten. Allerdings musste hierbei das Vorliegen von Fixationsartefakten berücksichtigt werden. Daher wurden unpermeabilisierte und permeabilisierte T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen - wiederum mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie - bezüglich der Lokalisation von Aktin, Alix, der ATP1A1-, ATP1A2- und ATP1A3-Untereinheiten von  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen, Centrin, GAPDH, LDH,  $\alpha$ -Tubulin und Hsp60 untersucht (Abbildung 4.9).

Wie aufgrund des ubiquitären Vorkommens letztgenannter Proteine und der für gewöhnlich zytosolischen Expression zu erwarten, waren alle Zielproteine innerhalb der permeabilisierten Zellen detektierbar. Im Falle von Aktin, GAPDH und LDH waren die Fluoreszenzsignale diffus und überwiegend gleichmäßig über die zytoplasmatischen Bereiche der Zellen verteilt (Abbildung 4.9 A, F, G). Die Aktin-Signale ließen jegliche filamentöse Organisation vermissen, was für Tumorzellen jedoch keine ungewöhnliche Beobachtung ist (Brinkley *et al.*, 1980). Die Lokalisationsmuster der  $\alpha$ -Tubulin-Signale entsprachen im Falle der T47D- und U2OS-Zellen den für filamentöse Strukturen zu erwartenden, erschienen bei den MCF7-Zellen hingegen diffus (Abbildung 4.9 H).

Die Hsp60-Signale akkumulierten außerhalb der Zellkerne in einer Vielzahl kleiner, länglich-ovaler und zusammenhängend erscheinender Bereiche (Abbildung 4.9 B), wie aufgrund der überwiegend mitochondrialen Lokalisation dieser Chaperone zu erwarten war (Cappello *et al.*, 2008). Alix erschienen bei allen drei Zelllinien gleichmäßig über Zytoplasma und Zellkerne verteilt, wobei im Bereich der Kerne auch kleine, lokale Akkumulationen von vesikulärer Erscheinung auftraten (Abbildung 4.9 C). Im Falle der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen waren die Fluoreszenzsignale bei den MCF7- und U2OS-Zellen ausschließlich im zytoplasmatischen Bereich, bei den T47D-Zellen hingegen innerhalb des gesamten Zellinnenraums gleichmäßig verteilt (Abbildung 4.9 D). Lokale Akkumulationen entlang der Zellperipherie waren nur bei den MCF7-Zellen zu beobachten.

Centrin war bei allen analysierten Zellen im gesamten Zellinnenraum detektierbar (Abbildung 4.9 E). Hinweise auf eine Akkumulation von Centrin-Signalen in Form einiger weniger punktförmiger Strukturen innerhalb der Zellen oder einem Punktpaar an jedem Zellpol, wie es für Tumorzellen in der Interphase beziehungsweise während der Mitose zu erwarten wäre (Paoletti *et al.*, 1996), ergaben sich nicht. Vielmehr waren die Centrin-Signale bei den MCF7-Zellen gleichmäßig verteilt, erschienen bei T47D- und U2OS-Zellen jedoch innerhalb der Zellkerne deutlich stärker als im umliegenden Zytoplasma (vergleiche Abbildungen 4.9 E und Anhang, Abbildung 9.7 E). Darüber hinaus zeigte sich bei den T47D-

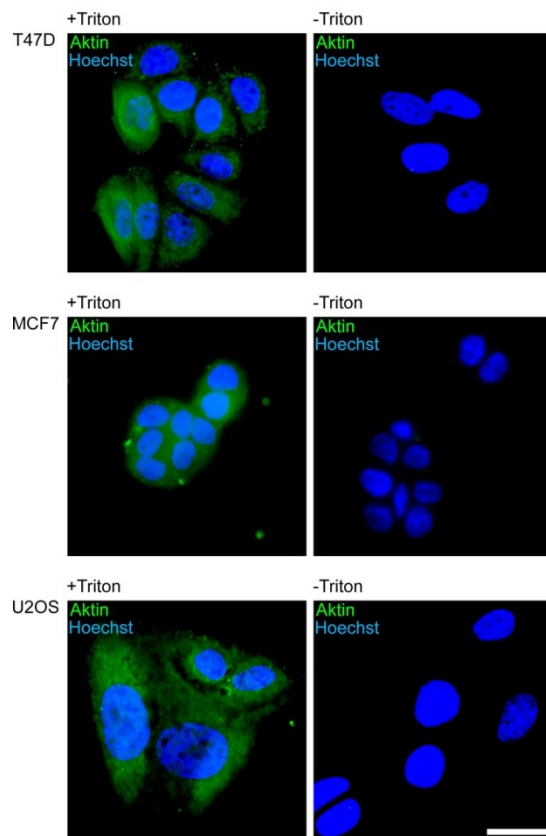
Zellen eine Akkumulation von Fluoreszenzsignalen in Form kleiner, punktförmiger Strukturen um die Zellkerne herum. Allerdings bindet der genutzte Centrin-Primärantikörper gemäß den Angaben des Herstellers nicht nur die Centrin-1-, sondern auch die Centrin-2-Isoform. Da darüber hinaus Zentrosomen-Hypertrophien für Tumorzellen nicht ungewöhnlich sind (Lingle *et al.*, 1998), entsprachen die Centrin-Lokalisationsmuster der analysierten Zellen grundsätzlich ebenfalls den Erwartungen.

Caveolin-1 war bei den MCF7-Zellen diffus und gleichmäßig über Zytoplasma und Zellkerne verteilt (Abbildung 4.9 I). Bei den U2OS-Zellen bildeten die Fluoreszenzsignale ein fein gepunktetes Muster, wobei lokale Akkumulationen nur zwischen aneinander angrenzenden Zellen zu beobachten waren. Im Gegensatz zu den MCF7- und U2OS-Zellen wiesen die T47D-Zellen sowohl Bereiche mit diffus und gleichmäßig verteiltem Caveolin-1, als auch solche mit punktförmig ausgeprägten Fluoreszenzsignalen auf. Darüber hinaus waren vereinzelte lokale Akkumulationen erkennbar. Diese traten jedoch nicht zwischen benachbarten, sondern bei einzelnen Zellen auf. Da vergleichbare Verteilungen von Caveolin-1 bereits demonstriert wurden (Pinaud und Dahan, 2011; Du *et al.*, 2014; He *et al.*, 2015) und das Protein in Zellkontaktbereichen akkumulieren kann (Galbiati *et al.*, 1998; Volonte *et al.*, 1999), entsprachen auch diese Lokalisationsmuster den Erwartungen.

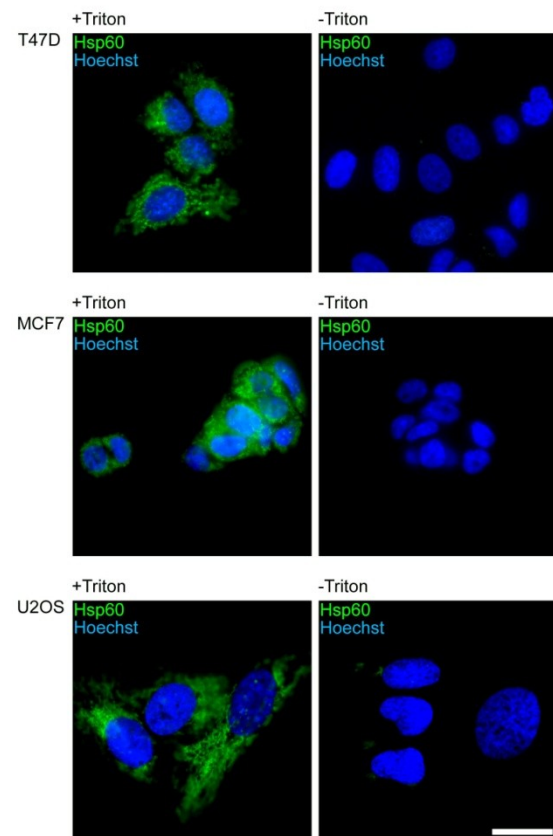
Im Gegensatz zur Analyse der permeabilisierten Proben lieferte die Untersuchung der unpermeabilisierten Zellen interessantere Resultate. Aktin konnte nur auf den MCF7-Zellen (Abbildung 4.9 A), Hsp60 nur auf den T47D- und U2OS-Zellen detektiert werden (Abbildung 4.9 B). In beiden Fällen waren die Fluoreszenzsignale jedoch extrem schwach und erschienen flächiger als die Hsp70-Cluster. Alle anderen Zielproteine waren auf den T47D- sowie MCF7- und U2OS-Zellen detektierbar, wobei die Fluoreszenzsignale im Falle von Centrin, GAPDH, LDH und  $\alpha$ -Tubulin in begrenzten Bereichen akkumulierten, deren Formen und Größen jenen der Hsp70-Cluster entsprachen (Abbildung 4.9 E, F, G, H).

Auch die Alix-Signale waren auf begrenzte Bereiche konzentriert, diese erschienen jedoch größer und insgesamt flächiger als die Hsp70-Cluster (Abbildung 4.9 C). Ein ähnliches Lokalisationsmuster war im Falle der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase auf den T47D- und U2OS-Zellen feststellbar, während das Lokalisationsmuster des Enzyms auf den MCF7-Zellen dem von Hsp70 entsprach (Abbildung 4.9 D). Caveolin-1 war auf den Oberflächen der T47D- und MCF7-Zellen weiträumig und flächig verteilt. Im Falle der MCF7-Zellen traten auch lokale Akkumulationen auf, deren Formen und Größen an die der Hsp70-Cluster heranreichten (Abbildung 4.9 I). Die unpermeabilisierten U2OS-Zellen hingegen wiesen ein punktförmiges Caveolin-1-Lokalisationsmuster auf, welches dem der permeabilisierten Zellen ähnelte.

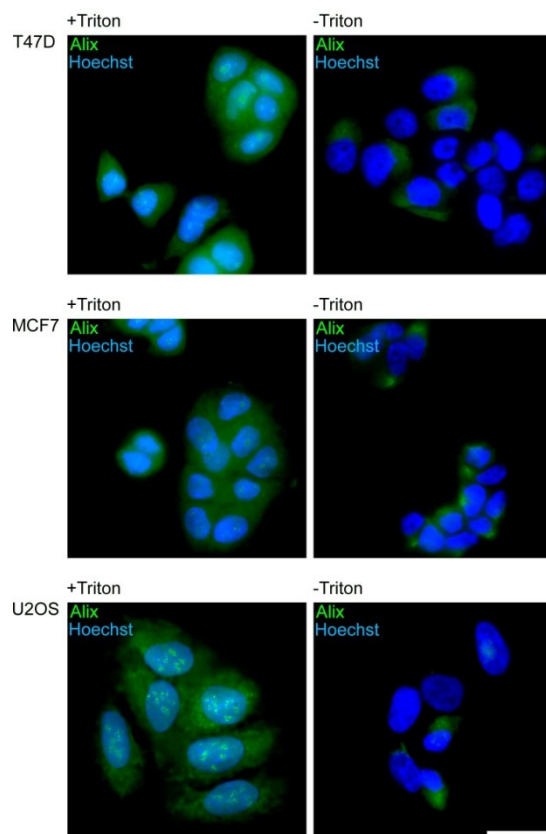
### A (Aktin)



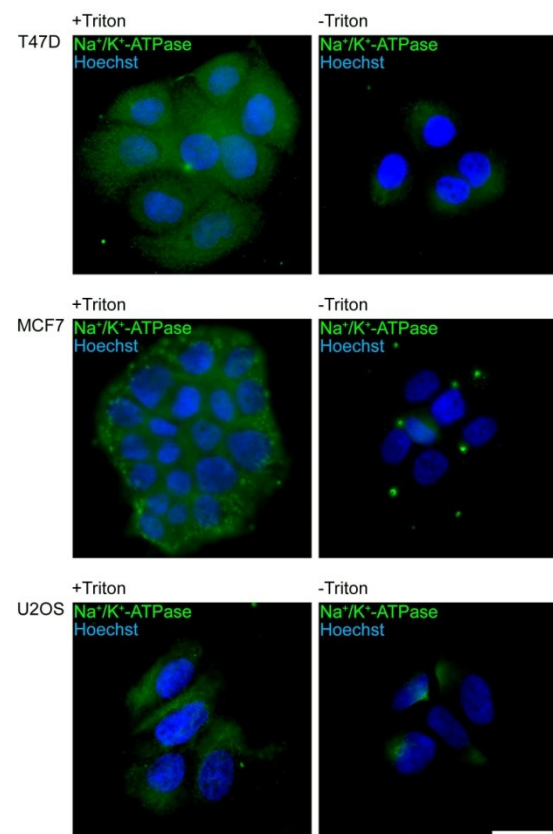
### B (Hsp60)



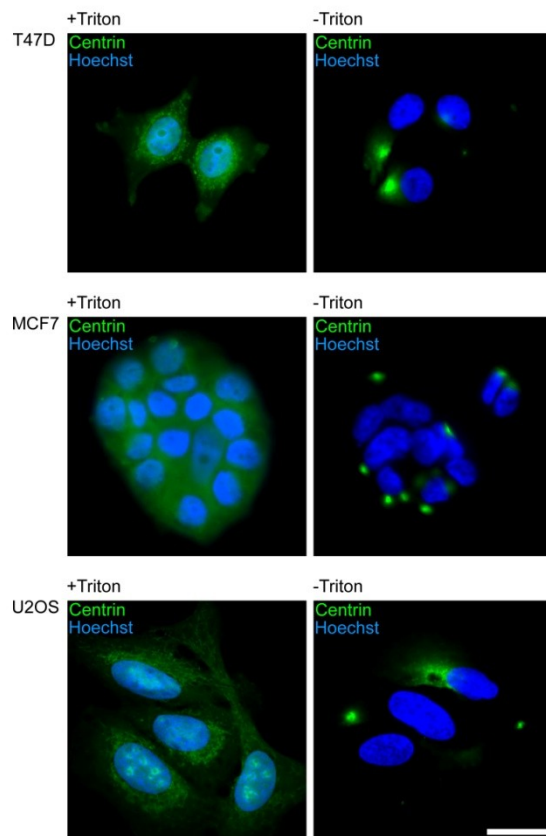
### C (Alix)



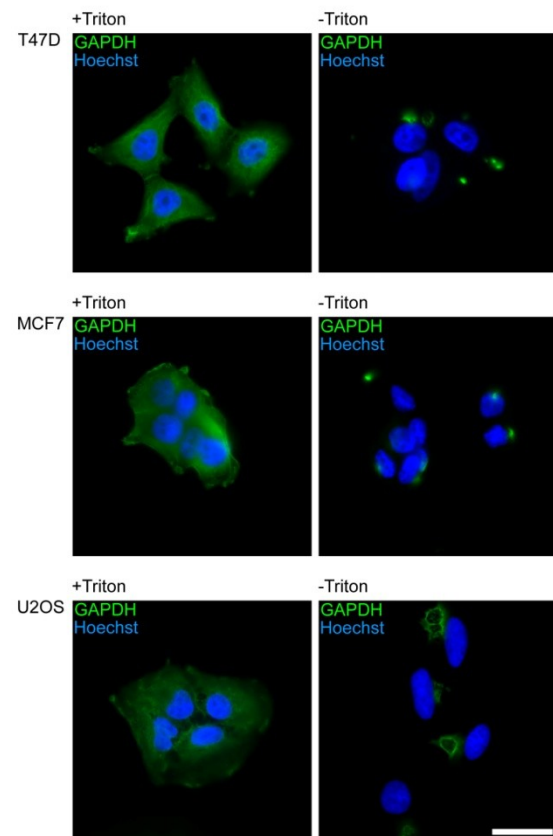
### D (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase)



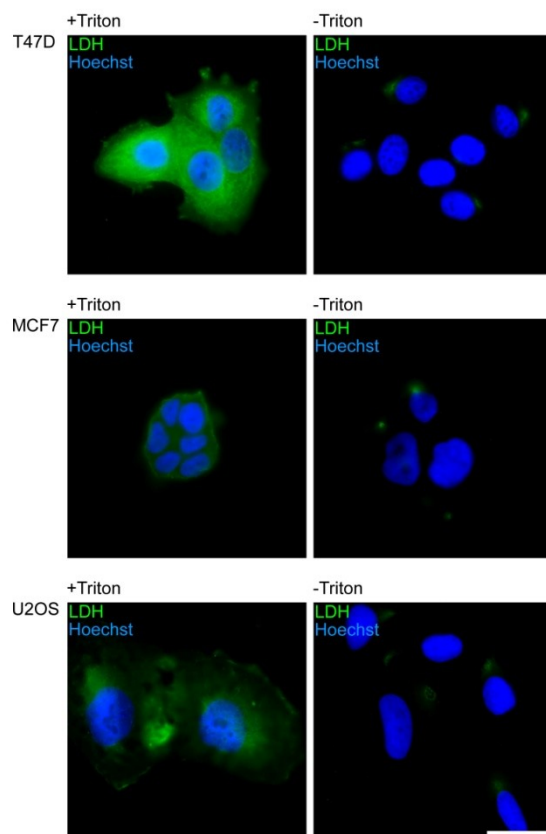
### E (Centrin)



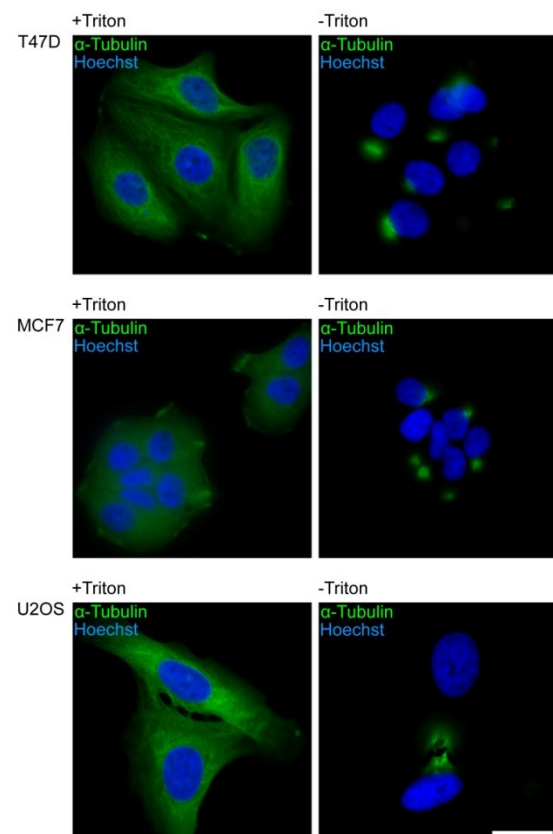
### F (GAPDH)

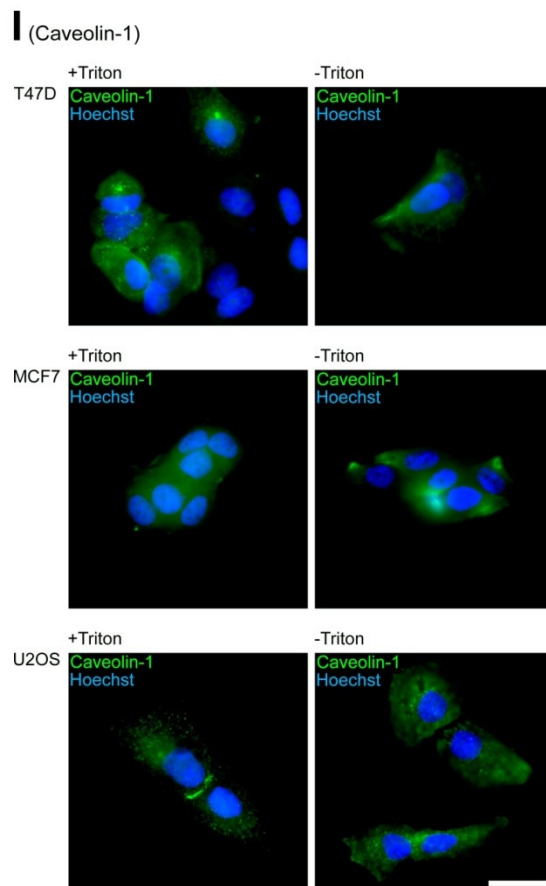


### G (LDH)



### H ( $\alpha$ -Tubulin)





**Abbildung 4.9: Auf der Oberfläche ungestresser Tumorzellen sind Alix sowie Caveolin-1 und die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen meist weiträumiger als Hsp70 verteilt, Centrin, GAPDH sowie LDH und  $\alpha$ -Tubulin hingegen zeigen ein den Hsp70-Clustern entsprechendes Lokalisationsmuster.** Ungestresste T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen wurden mit (+Triton) oder ohne Permeabilisierung (-Triton) für die Fluoreszenzmarkierung vorbereitet. Die Zielproteine Aktin (A), Hsp60 (B), Alix (C),  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (D), Centrin (E), GAPDH (F), LDH (G),  $\alpha$ -Tubulin (H) und Caveolin-1 (I) wurden indirekt immunfluoreszenzmarkiert, die DNS mit Hoechst 33342 gefärbt. Dargestellt sind die Überlagerungen der Einzelbilder der für die Visualisierung des jeweiligen Zielproteins (grün) und der DNS (blau) genutzten Detektionskanäle, aufgenommen mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI6000B, 63-fach Ölimmersionsobjektiv). Alle Mikroskop- beziehungsweise Softwareeinstellungen wurden zunächst zur Darstellung des jeweiligen Zielproteins in den permeabilisierten Zellen optimiert, falls erforderlich auf die entsprechende Negativkontrolle abgestimmt und im Anschluss ohne jedwede Änderungen für die entsprechenden unpermeabilisierten Präparate übernommen. Einzelkanalabbildungen und Bilder der jeweiligen Negativkontrollen sind im Anhang dargestellt (Abbildung 9.7). Maßstab: 25  $\mu\text{m}$ .

Die Caveolin-1-Lokalisationsmuster waren insofern auffällig, als Caveolin-1 nur in der inneren Schicht der Plasmamembran verankert ist. Daher sollte das Protein bei unpermeabilisierten Zellen für Antikörper nicht zugänglich sein (Williams und Lisanti, 2004). Allerdings demonstrierten Aoki *et al.* die Bildung einer die Plasmamembran vollständig durchspannenden Form von Caveolin-1 infolge einer Punktmutation in der Transmembranregion (Aoki *et al.*, 2010). Auch wird Caveolin-1 von einigen Tumorzelltypen sekretiert (Tahir *et al.*, 2001). Dementsprechend musste berücksichtigt werden, dass die analysierten Zellen Caveolin-1 in mutierter Form exprimieren könnten oder dass extrazelluläres Caveolin-1 auf den Oberflächen der Zellen mit Elementen der Plasmamembranen interagiert.

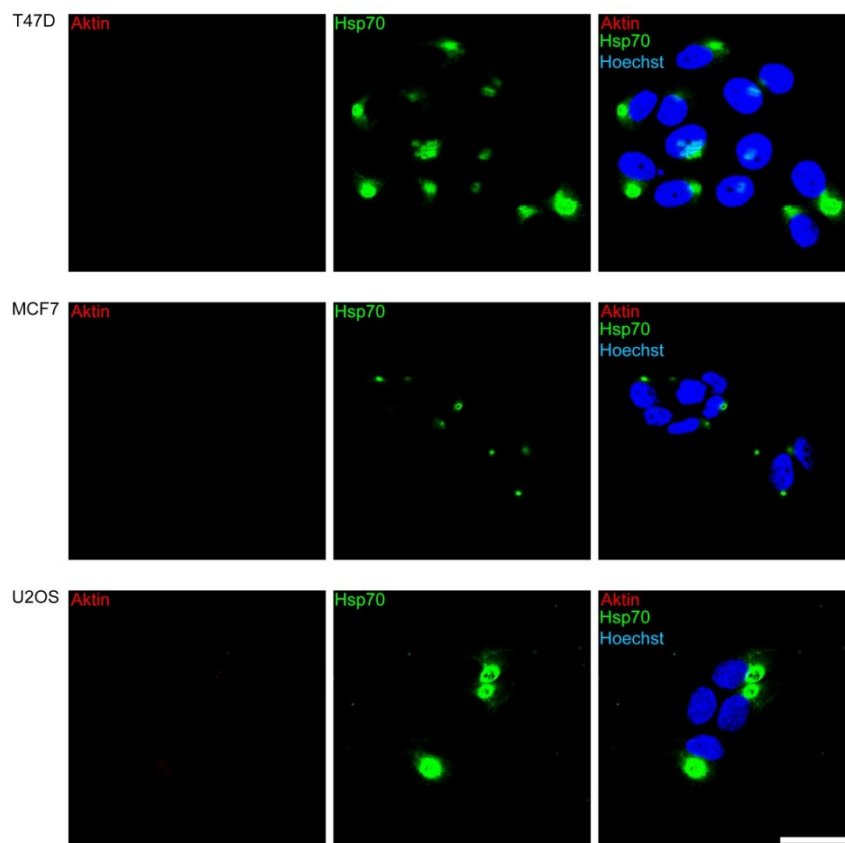
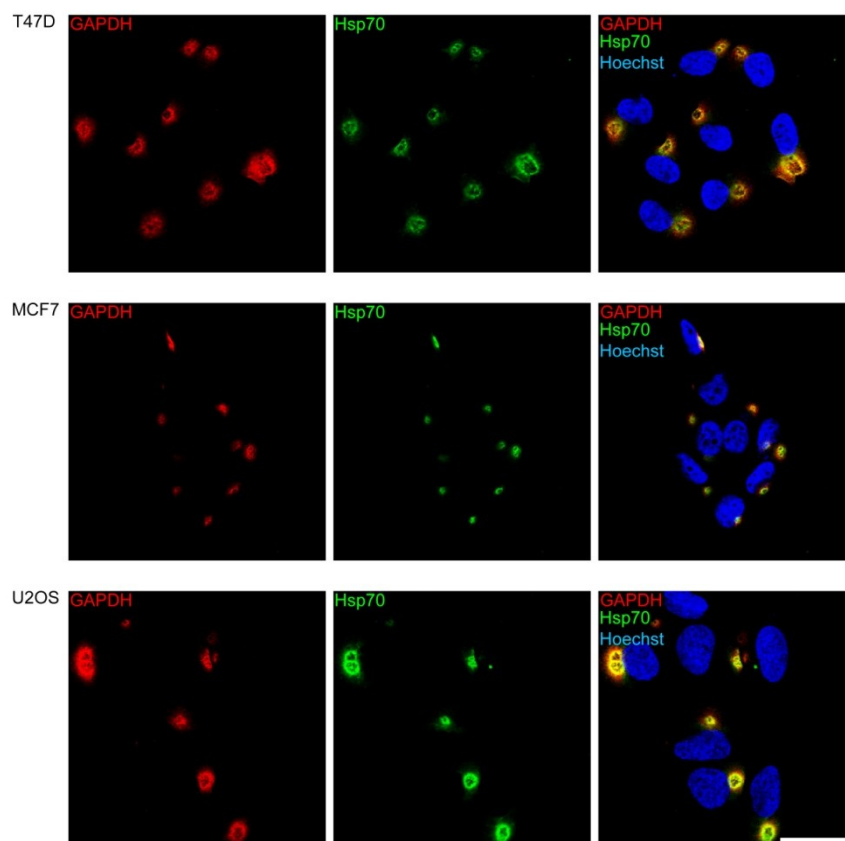
Weiterhin musste die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass durch die Fixierung ein ähnlicher Effekt ausgelöst wurde, wie ihn Aoki *et al.* beschrieben, wodurch nicht zwischen intra- und extrazellulärem Caveolin-1 unterschieden werden konnte. Im Gegensatz hierzu ist im Falle der anderen Zielproteine das Vorliegen von Fixationsartefakten unwahrscheinlich. Denn diese interagieren entweder ohnehin nur peripher mit Membranen (Alix, Bissig *et al.*, 2013; GAPDH, Montalbano *et al.*, 2012; Hsp60, Bruyn *et al.*, 2000), sind über Adapterproteine in diesen verankert (Aktin,  $\alpha$ -Tubulin), stellen Transmembranproteine

ne dar ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase) oder waren auf den unpermeabilisierten Zellen kaum beziehungsweise nicht detektierbar (Hsp60, Aktin). Davon abgesehen ist von gesunden beziehungsweise Tumorzellen bereits bekannt, dass auf deren Zellmembranen Alix, GAPDH und  $\alpha$ -Tubulin vorhanden sein können (Rubin *et al.*, 1982; Pan *et al.*, 2008a; Correa *et al.*, 2010). Außerdem sind GAPDH,  $\alpha$ -Tubulin und LDH zur direkten Interaktion mit PS fähig (Caron und Berlin, 1987; Terlecki *et al.*, 2006; Montalbano *et al.*, 2012), welches auf nicht-apoptotischen Tumorzellen vorhanden ist (Riedl *et al.*, 2011). Dementsprechend ließen die beschriebenen Ergebnisse vermuten, dass die T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen tatsächlich PS auf den extraplasmatischen Seiten der Plasmamembranen exponierten.

#### **4.2.4 Hsp70 kolokalisiert auf der extraplasmatischen Seite der Zellmembran von T47D-, MCF7- und U2OS-Tumorzellen mit GAPDH sowie $\alpha$ -Tubulin und Alix**

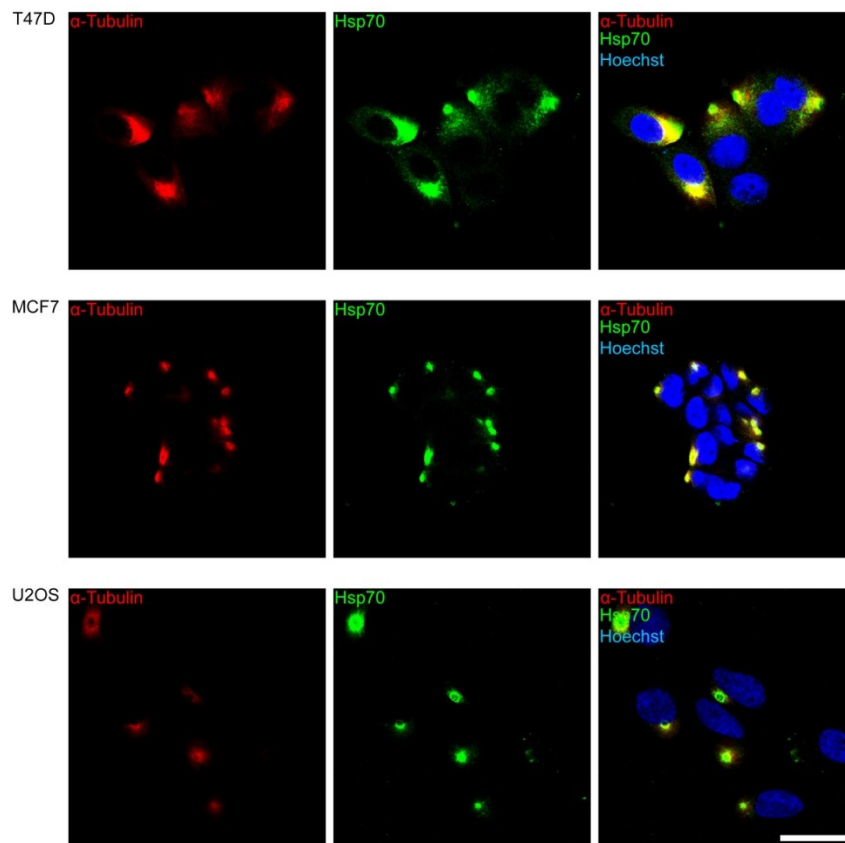
Wie zuvor beschrieben, ließen Formen und Größen der Hsp70-, GAPDH- und  $\alpha$ -Tubulin-Cluster auf den unpermeabilisierten Zellen vermuten, dass es sich bei den Clustern um in der Abschnürung begriffene oder mit der Zellmembran verschmelzende SVs handeln könnte. Da PS einen großen Teil der Membranlipide extrazellulärer Vesikel ausmacht (Lima *et al.*, 2009) und Hsp70, GAPDH sowie  $\alpha$ -Tubulin direkt mit PS interagieren (Caron und Berlin, 1987, 1987; Montalbano *et al.*, 2012; Mahalka *et al.*, 2014), erschien es denkbar, dass die Akkumulation der Proteine eine direkte Konsequenz der SV-Biogenese darstellen könnte. Da in letzterem Falle jedoch alle drei Proteine auf den Zelloberflächen kolokalisieren müssten, wurde diese Hypothese zunächst anhand von Kolokalisationsexperimenten überprüft. Hierfür wurden auf unpermeabilisierten Zellen jeweils zwei Zielproteine parallel immunfluoreszenzmarkiert, also jeweils Hsp70 und GAPDH,  $\alpha$ -Tubulin oder Aktin. Zur Markierung von Hsp70 kam wiederum der polyklonale Antikörper sc-1060 zum Einsatz. Die Analyse der resultierenden Proben erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie und wurde auf das multifunktionelle Protein Alix ausgedehnt. Dieses ist in die Regulation beziehungsweise den Aufbau von Zelladhäsionskomponenten und Bestandteilen der extrazellulären Matrix involviert, mit deren Beeinflussung im Fall der Abschnürung großer SVs zu rechnen war (Pan *et al.*, 2008a).

Wie Abbildung 4.10 A zeigt, war Aktin auf den unpermeabilisierten Zellen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie nicht detektierbar. Unter Berücksichtigung der extrem schwachen und eher flächig erscheinenden Aktin-Signale, die während der vorangegangenen fluoreszenzmikroskopischen Analyse auf den MCF7-Zellen aufgetreten waren (vergleiche Abbildung 4.9 A), ließ dies vermuten, dass Aktin auf den Plasmamembranen der analysierten Tumorzellen nur in relativ geringen Mengen vorhanden war.

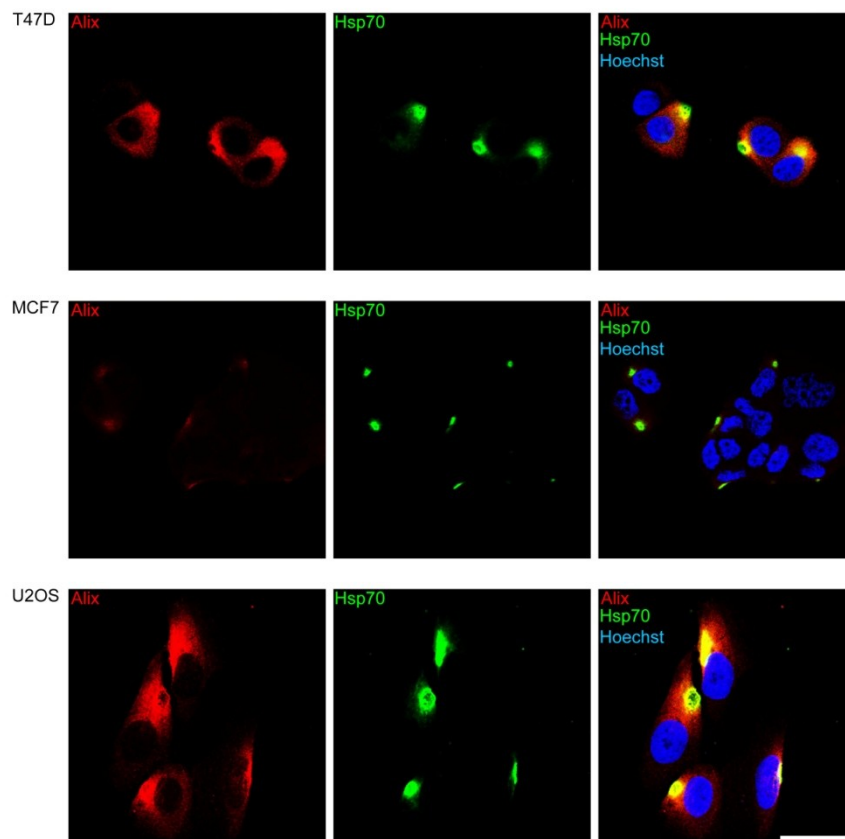
**A** (Aktin, Hsp70)**B** (GAPDH, Hsp70)



### C (α-Tubulin, Hsp70)



### D (Alix, Hsp70)



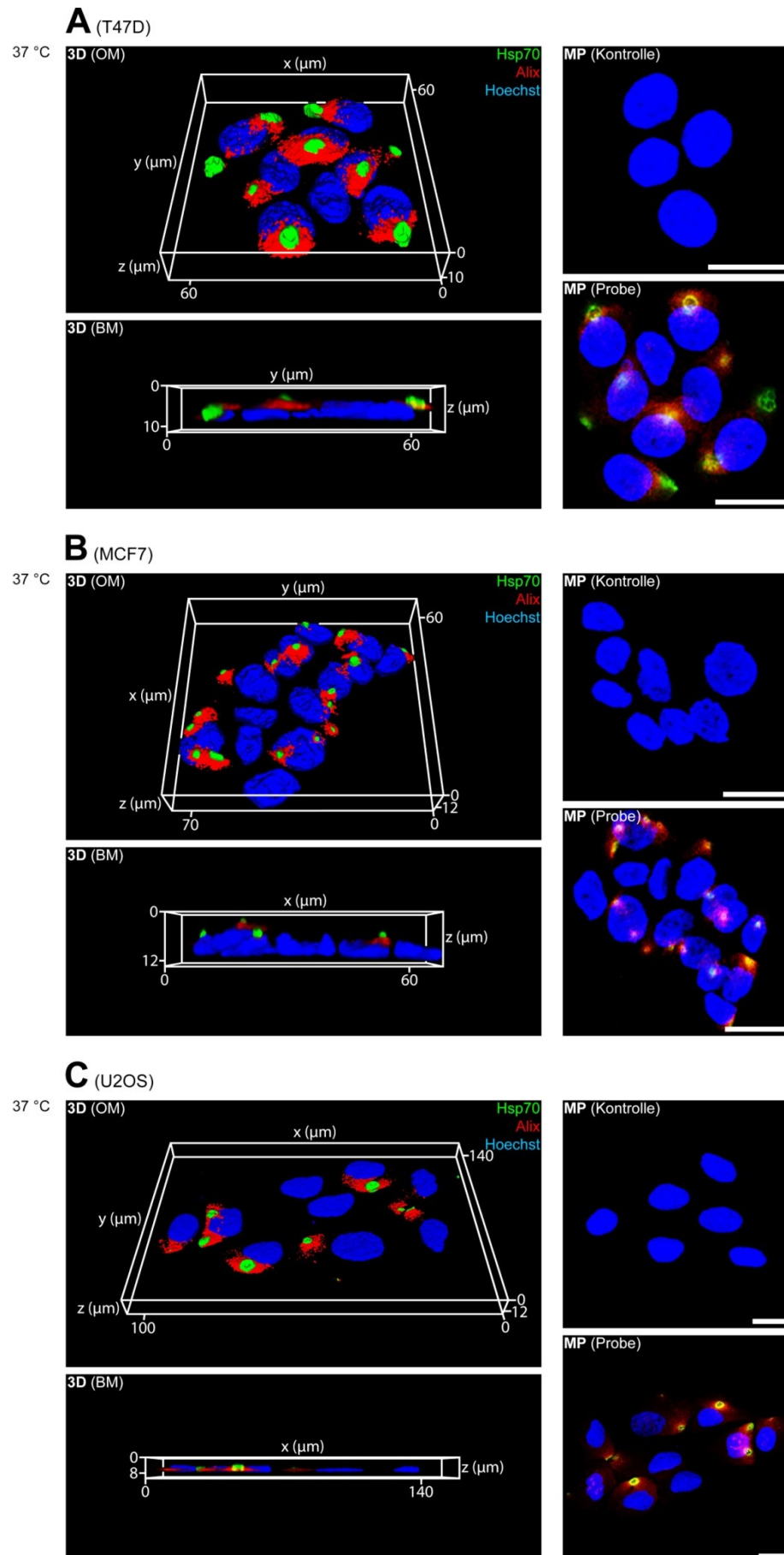


**Abbildung 4.10: Auf den Oberflächen ungestresster Tumorzellen kolokalisieren GAPDH,  $\alpha$ -Tubulin und Alix mit Hsp70.** Ungestresste T47D, MCF7- und U2OS-Zellen wurden ohne Permeabilisierung für die Fluoreszenzmarkierung vorbereitet und jeweils zwei Zielproteine in folgenden Kombinationen parallel indirekt immunfluoreszenzmarkiert: Hsp70 und Aktin (A), Hsp70 und GAPDH (B), Hsp70 und  $\alpha$ -Tubulin (C) sowie Hsp70 und Alix (D). Zur Markierung von Hsp70 wurde jeweils der polyklonalen (Primär-) Antikörper sc-1060 genutzt, die Markierung der DNS erfolgte mittels Hoechst 33342. Dargestellt sind Einzelbilder der für Hsp70 (grün) sowie das jeweilige zweite Zielprotein (rot) genutzten Detektionskanäle, sowie die Überlagerung dieser beiden Bilder mit dem jeweils zugehörigen Einzelbild des für die DNS genutzten Detektionskanals (blau), aufgenommen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica TCS SP2, 40-fach Ölimmersionsobjektiv). Die jeweiligen Einzelkanalabbildungen und Bilder der entsprechenden Negativkontrollen sind im Anhang enthalten (Abbildung 9.8). Maßstab: 50  $\mu$ m.

Im Gegensatz zu Aktin waren GAPDH,  $\alpha$ -Tubulin und Alix und den Oberflächen der T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen detektierbar (Abbildung 4.10 B, C, D). Die Lokalisierungsmuster unterschieden sich nicht von den zuvor beschriebenen (vergleiche Abbildung 4.9 C, F, H). Zudem überlappten die Hsp70-Signale bei allen drei Zelllinien stets präzise mit den GAPDH- beziehungsweise  $\alpha$ -Tubulin-Signalen. Dies zeigte sehr deutlich, dass die drei letztgenannten Proteine auf den extraplasmatischen Seiten der Plasmamembranen der analysierten Tumorzellen tatsächlich an denselben Stellen lokalisiert waren.

Auch die Hsp70- und Alix-Signale überschnitten sich auf den Zellen (Abbildung 4.10 D). Ein präzises Überlappen der Fluoreszenzsignale war jedoch nur auf den MCF7-Zellen feststellbar. Auf den T47D- und U2OS-Zellen hingegen schien Alix insgesamt deutlich flächiger und weiträumiger verteilt als Hsp70, akkumulierte jedoch generell nur in den Bereichen, in welchen auch Hsp70-Signale detektierbar waren. Dabei schienen die Hsp70-Cluster in die Alix-positiven Bereiche der Plasmamembran "eingebettet" zu sein. Maximalprojektionen und 3D-Rekonstruktionen konfokaler Z-Bildstapel bestätigten diesen Eindruck (Abbildung 4.11). Darüber hinaus ließen die 3D-Modelle erkennen, dass sowohl die Hsp70-Cluster als auch die Alix-positiven Flächen strikt auf apikale und laterale Bereiche der Zellperipherie beschränkt waren. Akkumulationen von Hsp70-Signalen in Form ovaler oder runder, vesikulär erscheinender Strukturen in Bereichen, in denen Alix nicht detektiert werden konnte, waren nur bei den T47D-Zellen zu beobachten.

Zusammenfassend betrachtet zeigen die Ergebnisse der Kolokalisationsexperimente sehr deutlich, dass im Falle der untersuchten T47D-, MCF7- und U2OS-Tumorzellen die Proteine Hsp70, GAPDH und  $\alpha$ -Tubulin auf den extraplasmatischen Seiten der Plasmamembranen an denselben Stellen konzentriert sind. Unter Berücksichtigung der Fähigkeit dieser Proteine zur Interaktion mit PS und der Präsenz von Alix in der Umgebung der Cluster scheint somit wahrscheinlich, dass innerhalb dieser Bereiche SVs mit Durchmessern von drei (MCF7) beziehungsweise von bis zu zehn Mikrometern (T47D, U2OS) von den Plasmamembranen abgeschnürt werden oder mit diesen verschmelzen.



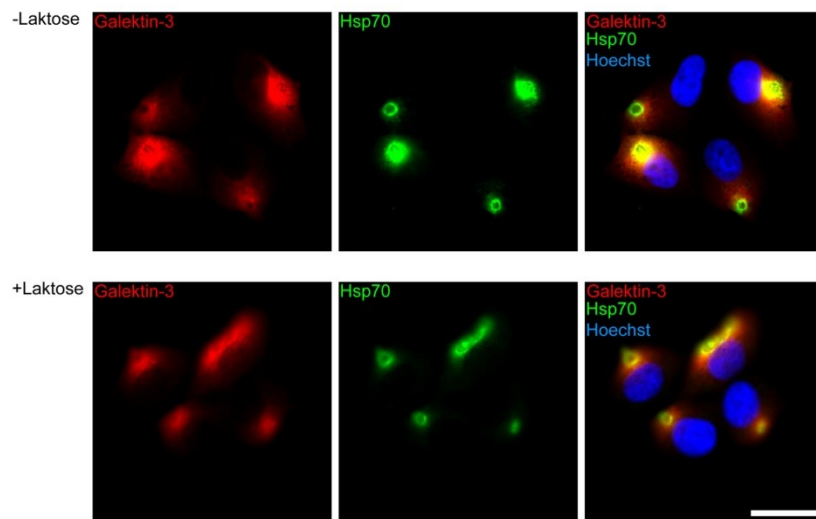
**Abbildung 4.11: Das multifunktionelle Protein Alix ist auf der Oberfläche von Tumorzellen weiträumiger verteilt als Hsp70, akkumuliert aber nur nahe der Hsp70-Cluster.** Ungestresste T47D- (A), MCF7- (B) und U2OS-Zellen (C) wurden ohne Permeabilisierung für die Fluoreszenzmarkierung vorbereitet und die Zielproteine Hsp70 (grün) sowie Alix (rot) parallel indirekt immunfluoreszenzmarkiert. Für die Markierung von Hsp70 wurde der polyklonale (Primär-) Antikörper sc-1060 genutzt, die Markierung der DNS erfolgte mit Hoechst 33342 (blau). Z-Bilderstapel repräsentativer Zellen wurden mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops aufgenommen (Leica TCS SP2, 40-fach Ölimmersionsobjektiv). Aus diesen wurden Maximalprojektionen (MP) sowie 3D-Rekonstruktionen im Oberflächenmodus (OM) und horizontale Querschnitte im Überblendungsmodus (BM) generiert. Maßstab: 20 µm.

### 4.3 Galektin-3 interagiert auf den Oberflächen von T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen mit nicht-glykosylierten Membranelementen

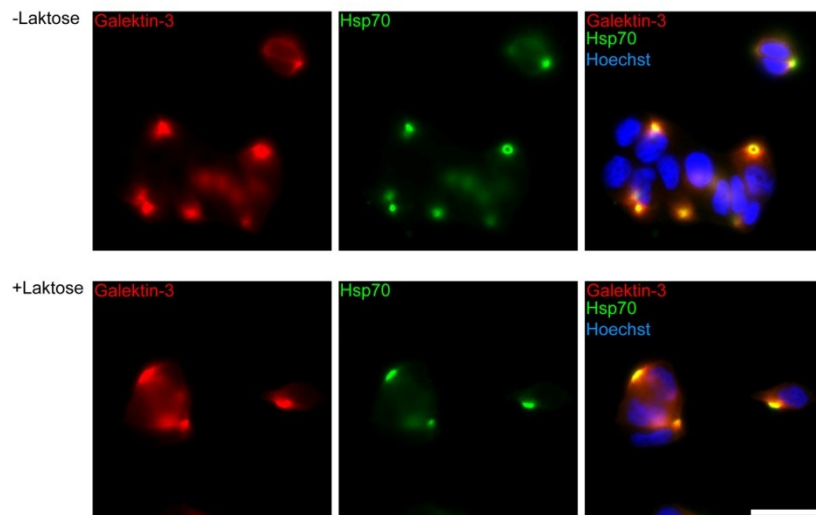
Die zuvor beschriebenen Ergebnisse ließen vermuten, dass die Tumorzellen bestimmte Phospholipide innerhalb begrenzter Bereiche der Plasmamembran externalisieren und sowohl diese, als auch die mit den Lipiden interagierenden Proteine in Form großer SVs freisetzen. Rückschlüsse über die Aufrechterhaltung der damit zwangsläufig einhergehenden asymmetrischen Verteilung der Membranlipide waren hingegen nicht möglich. Jedoch waren bei vorbereitenden Experimenten auf unpermeabilisierten MCF7-Zellen Akkumulationen von Galektin-3 beobachtet worden, die den Hsp70-Clustern ähnelten (vergleiche Anhang, Abbildung 9.9). Interessanterweise kann Galektin-3 nicht nur an glykosylierte Lipide und Proteine binden, sondern durch Oligomerisierung auch die Bildung hochmolekularer Lipid- beziehungsweise Proteincluster induzieren (von Mach, 2013). Dementsprechend lag die Vermutung nahe, Galektin-3 könne in die Bildung oder Aufrechterhaltung der auf den Tumorzellen gefundenen Proteincluster involviert sein. Eine Möglichkeit zur Prüfung der letztgenannten Hypothese ergab sich aus der Tatsache, dass die Bindung von Galektin-3 zu entsprechenden Glykoliganden durch Zugabe von Laktose aufgelöst werden kann. Daher wurden Hsp70 und Galektin-3 auf unpermeabilisierten T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen parallel indirekt immunfluoreszenzmarkiert, wobei ein Teil der Proben vor der Präparation zunächst mit Laktose behandelt wurde. Die Analyse der resultierenden Präparate erfolgte mittels klassischer Fluoreszenzmikroskopie.

Die Resultate der Kolo-kalisationsexperimente zeigten auf den T47D- und MCF7-Zellen eine im Vergleich zu Hsp70 geringfügig flächigere Verteilung von Galektin-3 (Abbildung 4.12). Allerdings akkumulierten die Galektin-3-Signale in den Bereichen der Hsp70-Cluster deutlich erkennbar (Abbildung 4.12 A, B). Im Gegensatz zu den beiden Mammakarzinom-Zelllinien waren auf den U2OS-Zellen nur relativ schwache Galektin-3-Signale detektierbar, die zudem sehr viel flächiger verteilt waren und in den Bereichen der Hsp70-Cluster nur geringfügig akkumulierten (Abbildung 4.12 C).

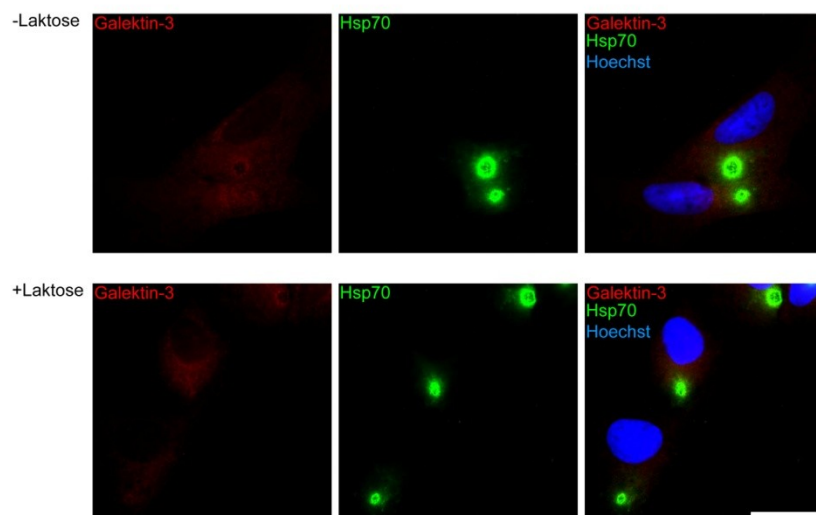
## A (T47D)



## B (MCF7)



## C (U2OS)



**Abbildung 4.12: Galektin-3 ist auf Oberfläche von Mammakarzinom-Zellen nur geringfügig weiträumiger verteilt als Hsp70, kolokalisiert mit diesem in eng begrenzten Bereichen und lässt sich durch Laktose nicht entfernen.** Ungestresste T47D- (A), MCF7- (B) und U2OS-Zellen (C) wurden 72 Stunden nach der Aussaat zunächst mit 150-millimolarer Laktose-Lösung vorbehandelt (+Laktose; 4,0 °C, 45 Minuten) und danach zusammen mit unbehandelten Zellen (-Laktose) ohne Permeabilisierung für die Fluoreszenzmarkierung vorbereitet. Die Zielproteine wurden indirekt immunfluoreszenzmarkiert, wobei die Markierung von Hsp70 mittels des polyklonalen (Primär-) Antikörper sc-1060 erfolgte. Die DNS wurde mit Hoechst 33342 gefärbt. Dargestellt sind Einzelbilder der für Hsp70 (grün) sowie Galektin-3 (rot) genutzten Detektionskanäle, sowie Überlagerungen beider Bilder mit dem jeweils zugehörigen Einzelbild des für die DNS genutzten Detektionskanals (blau), aufgenommen mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI6000B, 63-fach Ölimmersionsobjektiv). Alle Mikroskop- beziehungsweise Softwareeinstellungen wurden zunächst zur Darstellung der Zielproteine auf den nicht mit Laktose vorbehandelten Zellen optimiert, falls erforderlich auf die entsprechenden Negativkontrollen abgestimmt und im Anschluss ohne Änderungen für die vorbehandelten Präparate übernommen. Alle Einzelkanalabbildungen und Bilder der jeweiligen Negativkontrollen sind im Anhang dargestellt (Abbildung 9.10). Maßstab: 25 µm.

Somit konnte davon ausgegangen werden, dass auf den T47D- und MCF7-Zellen der überwiegende, auf den U2OS-Zellen hingegen nur ein geringer Anteil des vorhandenen Galektin-3 mit Hsp70 kolokalisierte. Erstaunlicherweise änderten sich infolge der Behandlung der Zellen mit Laktose weder die Lokalisationsmuster von Galektin-3 oder Hsp70, noch die Intensitäten der entsprechenden Fluoreszenzsignale. In Anbetracht der von Lukyanov *et al.* demonstrierten direkten Interaktion von Galektin-3 mit Phospholipiden und Cholesterol (Lukyanov *et al.*, 2005) ließ dies vermuten, Galektin-3 könne auch auf den Tumorzellen unabhängig von Glykosylierungen mit Membranlipiden interagieren. Allerdings bindet Galektin-3 einige komplexere beziehungsweise stark verzweigte Oligosaccharide mit deutlich höherer Affinität als das vergleichsweise simple Disaccharid Laktose (Fortuna-Costa *et al.*, 2014). Somit musste die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Galektin-3 auf den Oberflächen der analysierten Tumorzellen nicht oder nicht nur als peripheres Membranprotein, sondern ganz oder teilweise an entsprechend komplex glykosylierte Membranelemente gebunden vorliegen könnte. Dementsprechend konnte eine direkte Beteiligung von Galektin-3 an der Bildung beziehungsweise Aufrechterhaltung der Proteincluster weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

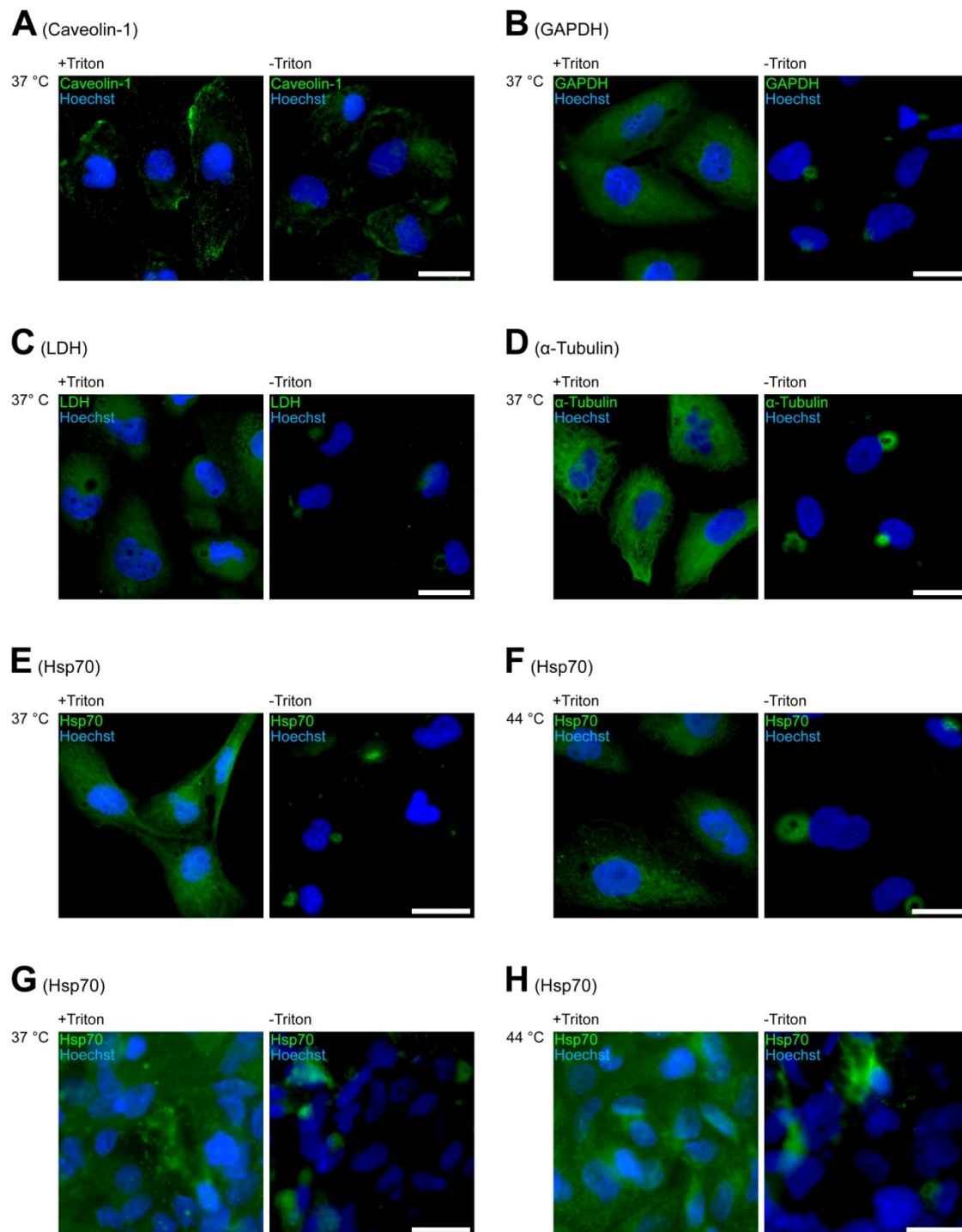
#### **4.4 Auch immortalisierte HK2-Zellen exponieren neben Hsp70 auch GAPDH, LDH, $\alpha$ -Tubulin und Caveolin-1 auf den Zelloberflächen**

Im Falle des peripheren Hsp70 steht die Forschung erst am Anfang. Daher musste die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass es sich bei den Hsp70-Clustern um Zellkulturartefakte handeln könnte, diese also von Tumorzellen in ihrem natürlichen Milieu nicht oder seltener gebildet werden. Um dies auszuschließen, hätten idealerweise primäre Zelllinien auf Vorhandensein und Lokalisation von peripherem Hsp70 geprüft werden müssen. Da diese nicht zur Verfügung standen, wurde auf HK2-Zellen zurückgegriffen. Diese Zell-

linie geht auf humane Nierenzellen des proximalen Tubulusepithels zurück und wurde durch Immortalisierung beziehungsweise durch Transduktion der ursprünglich gesunden Zellen mit replikationsdefekten retroviralen Vektoren erzeugt (Ryan *et al.*, 1994). HK2-Zellen exprimieren Hsp70 zwar auch unter physiologischen Bedingungen (Myung *et al.*, 2004), ob dies aber auch zu einer Exposition der Chaperone auf der Plasmamembran führt, war bislang unbekannt. Daher wurden Hsp70 sowie Caveolin-1, GAPDH, LDH und  $\alpha$ -Tubulin auf unpermeabilisierten beziehungsweise in permeabilisierten HK2-Zellen indirekt immunfluoreszenzmarkiert und analog zur für die Tumorzelllinien beschriebenen Vorgehensweise mittels klassischer Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Zunächst wurden HK2-Zellen untersucht, die in geringer Zelldichte ausgesät worden waren. Hierbei konnten interessanterweise keine signifikanten Unterschiede zwischen den immortalisierten HK2-Zellen und den Tumorzelllinien beobachtet werden: Caveolin-1 zeigte bei unpermeabilisierten und permeabilisierten Proben eine ähnliche punktförmige Verteilung (Abbildung 4.13 A), wie sie bereits im Falle der U2OS-Zellen beobachtet worden war (vergleiche Abbildung 4.9 I). Die GAPDH-, LDH- und Hsp70-Signale erschienen innerhalb der permeabilisierten Zellen diffus und waren gleichmäßig verteilt, die  $\alpha$ -Tubulin-Signale ließen filamentöse Strukturen erkennen (Abbildung 4.13 B, C, D, E). Auf den unpermeabilisierten HK2-Zellen hingegen akkumulierten nicht nur Hsp70, sondern auch GAPDH, LDH und  $\alpha$ -Tubulin in eng begrenzten Bereichen, deren Formen und Größen denen der Cluster auf den Tumorzellen entsprachen.

Da Kim *et al.* postulierten, die genetischen Auswirkungen der Immortalisierung habe bei den HK2-Zellen keine Hsp70-Stressantwort ausgelöst (Kim *et al.*, 2001), wurden auch gestresste Zellen in die Analyse einbezogen. Hierbei zeigten sich jedoch bezüglich der Hsp70-Signalintensitäten und Lokalisationsmuster keine signifikanten Unterschiede zwischen ungestressten (Abbildung 4.13 E) und gestressten Zellen (Abbildung 4.13 F). Da HK2-Zellen bei Kultivierung auf permeablen Filtern ein einschichtiges Epithel bilden können (Ryan *et al.*, 1994), bestand der Verdacht, die beobachteten Stresssymptome könnten auf die Vereinzelung der Zellen zurückzuführen sein. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden HK2-Zellen unter bestmöglichen Bedingungen kultiviert und nach Epithelbildung auf Expression und Lokalisation von Hsp70 unter physiologischen Bedingungen sowie nach Stressexposition untersucht (Abbildung 4.13, G, H). Auch hierbei war Hsp70 jedoch bei ungestressten und gestressten Zellen detektierbar, wobei sich die Hsp70-Lokalisationsmuster nur geringfügig von jenen unterschieden, die bei Aussaat in geringer Zelldichte beobachtet worden waren (Abbildung 4.13 E, F).



**Abbildung 4.13: Auch immortalisierte HK2-Zellen exprimieren und exponieren Hsp70, GAPDH, LDH und  $\alpha$ -Tubulin in Clustern, die in Form und Größe den Proteinclustern auf den Tumorzellen entsprechen.** Ungestresste (37 °C) und gestresste (44 °C, 25 Minuten, acht Stunden Erholungszeit bei 37 °C) HK2-Zellen geringer (A - F;  $3 \times 10^4$  Zellen / Probe) oder hoher Zelldichte (G, H; konfluent) wurden mit (+Triton) oder ohne Permeabilisierung (-Triton) für die Fluoreszenzmarkierung vorbereitet. Die Zielproteine Caveolin-1 (A), GAPDH (B), LDH (C),  $\alpha$ -Tubulin (D) und Hsp70 (E - H) wurden indirekt immunfluoreszenzmarkiert, die DNS mit Hoechst 33342 gefärbt. Dargestellt sind Überlagerungen der Einzelbilder der für Zielproteine (grün) und DNS (blau) genutzten Detektionskanäle, aufgenommen mit einem Leica DMI6000B (63-fach Ölimmersionsobjektiv). Alle Mikroskop- beziehungsweise Softwareeinstellungen wurden zur Darstellung des jeweiligen Zielproteins in den permeabilisierten Zellen optimiert, auf die Negativkontrollen abgestimmt und ohne Änderungen für die unpermeabilisierten Präparate übernommen. Einzelkanalabbildungen und Bilder der entsprechenden Negativkontrollen sind im Anhang dargestellt (Abbildung 9.11). Maßstab: 25 µm.

Auf den unpermeabilisierten Zellen erschienen die Hsp70-Singale insgesamt zwar weiträumiger verteilt, trotzdem waren vereinzelt lokale Akkumulationen erkennbar, die den Hsp70-Clustern auf den Tumorzellen in Form und Größe ähnelten. Da Kim *et al.* keinen Vergleich der basalen Hsp70-Expressionsintensitäten von gesunden und immortalisierten Zellen durchführten (Kim *et al.*, 2001), konnte somit nicht ausgeschlossen werden, dass die Bildung der Proteincluster auf den Zelloberflächen auf eine durch Immortalisierung oder Kultivierung ausgelöste dauerhafte Stressantwort zurückzuführen ist. Unter Berücksichtigung der zuvor für die Tumorzellen beschriebenen Ergebnisse musste somit davon ausgegangen werden, dass die Abschnürung großer SVs kein spezifisches Verhalten von Tumorzellen, sondern sehr wahrscheinlich ein Merkmal gestresster Zellen ist.

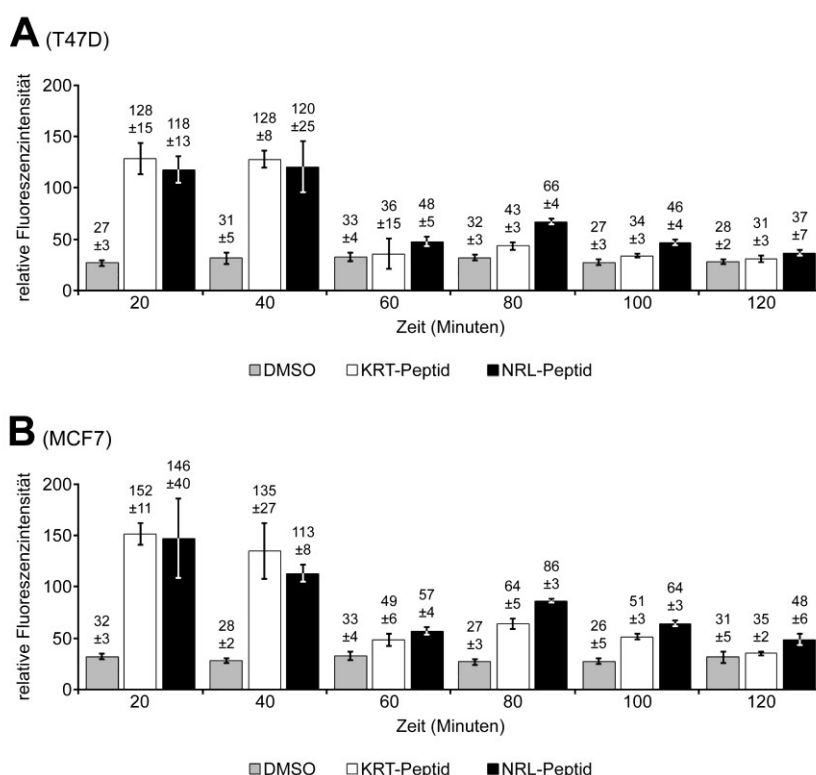
#### **4.5 Mittels Fluorochrom-gekoppelter Substratpeptide lässt sich das auf den Oberflächen der Zellen exponierte Hsp70 nicht markieren**

Abschließend wurde geprüft, ob das integrale beziehungsweise das periphere Hsp70 mit Fluorochrom-gekoppelten Substratpeptiden markiert werden kann. Als Substrat wurde hierzu das von Zhu *et al.* charakterisierte Peptid (Asparagin-Arginin-Leucin-Leucin-Leucin-Threonin-Glycin; Zhu *et al.*, 1996) genutzt, an dessen N-Terminus eine Oligopeptid (Threonin-Threonin-Asparaginsäure-Serin) und daran anschließend das Fluorochrom 5(6)-Carboxyfluorescein (CFL) gekoppelt worden war (nachfolgend vereinfachend als "NRL-Peptid" bezeichnet). Das Oligopeptid diente hierbei der Vermeidung sterischer Substituenteneffekte. Als Negativkontrolle kam ein Peptid zum Einsatz, welches dem NRL-Peptid mit Ausnahme der drei zentralen, hydrophoben Leucin-Reste entsprach. Diese wurden durch hydrophile Asparagin-Reste substituiert, um eine Interaktion des Peptides mit der Substratbindedomäne von Hsp70 zu verhindern (nachfolgend vereinfachend als "Kontroll-Peptid" bezeichnet oder mit "KTR-Peptid" abgekürzt).

Zunächst sollte die für eine fluoreszenzmikroskopische Detektion der NRL-Peptide erforderliche Inkubationszeit bestimmt werden. Hierzu wurden T47D- und MCF7-Zellen bei 4,0 °C vorinkubiert, um eine Aufnahme der Peptide durch Endozytose zu verhindern. Nach Zugabe der Peptide wurden die Zellen über einen Zeitraum von insgesamt 120 Minuten weiterhin bei 4,0 °C inkubiert und alle 20 Minuten Proben entnommen. Danach wurden die Zellen homogenisiert, die Proteinkonzentrationen bestimmt, wenn erforderlich angeglichen und die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten der resultierenden Homogenate mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes gemessen. Hierbei zeigte sich nach 20 beziehungsweise 40 Minuten bei beiden Zelllinien ein extremer Anstieg der Fluoreszenzintensitäten, der aller-



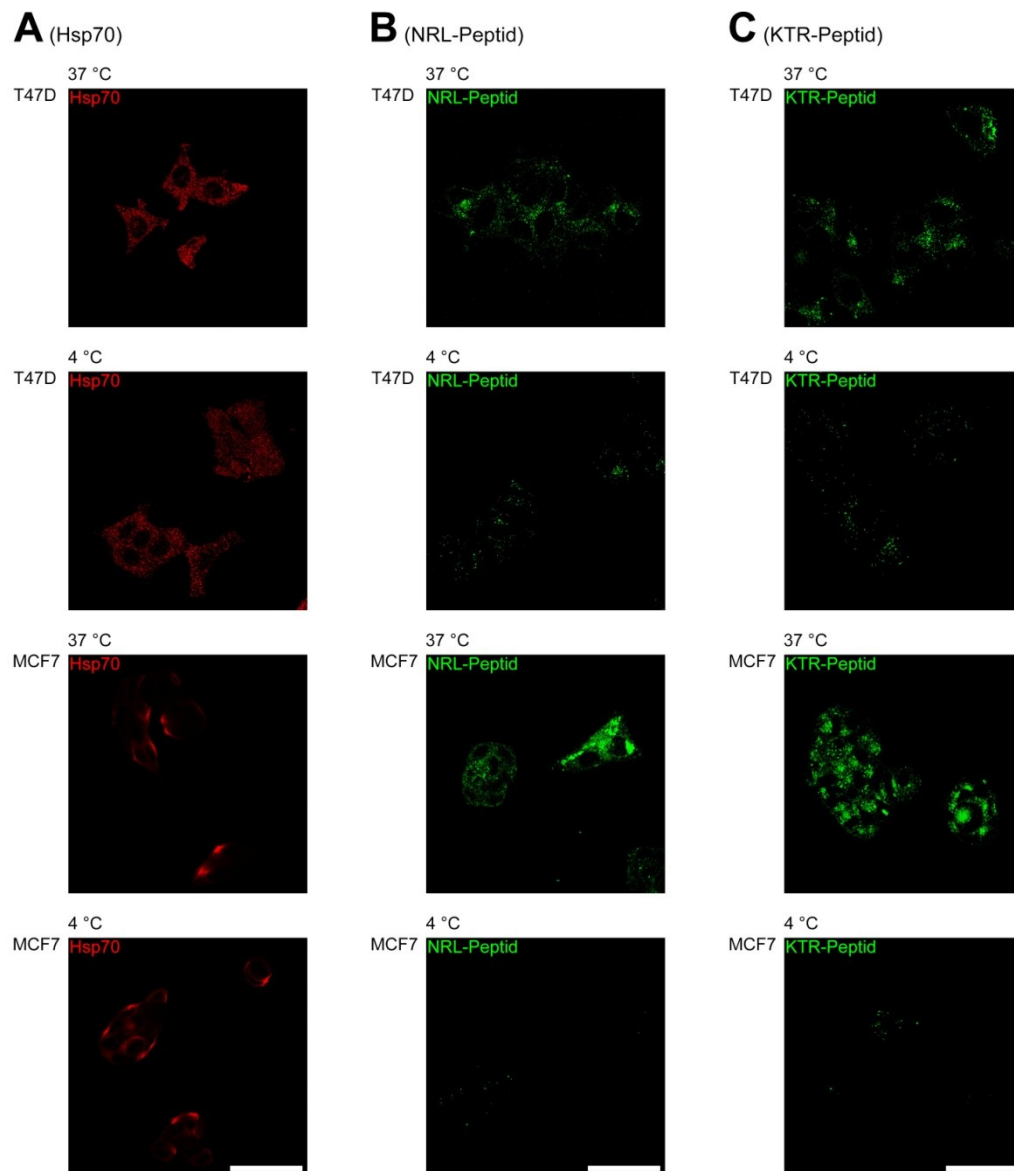
dings bei NRL- und KTR-Peptiden ähnlich stark ausgeprägt war (Abbildung 4.14). Bis 60 Minuten nach Zugabe der Peptide reduzierten sich die Intensitäten deutlich und lagen nur noch geringfügig über den Werten, die ohne Zugabe von Peptiden feststellbar waren. Allerdings waren die Intensitätswerte im Falle der mit den NRL-Peptiden behandelten Zellen meist geringfügig höher als die Werte, welche bei Nutzung der KTR-Peptide gemessen werden konnten. Die größten Differenzen zwischen den mit NRL- beziehungsweise KTR-Peptiden behandelten Zellen ergaben sich mit  $23 \pm 6,8$  (T47D) beziehungsweise  $22 \pm 7,5$  (MCF7) relativen Fluoreszenzeinheiten nach 80 Minuten Inkubationszeit. Daher wurde diese Inkubationsdauer für alle nachfolgend beschriebenen Experimente genutzt.



**Abbildung 4.14: Fluorochrom-gekoppelte Substrat- und Kontrollpeptide interagieren mit Komponenten der Plasmamembran von Mamakarzinom-Zellen.** Ungestresste T47D- (A) und MCF7-Zellen (B) wurden nach der Aussaat für 72 Stunden bei 37 °C kultiviert. Nach Vorinkubation bei geringer Temperatur (4,0 °C, 30 Minuten) wurden 5(6)-Carboxyfluorescein (CFL) gekoppelte Peptide in konstanter Konzentration (10,4 Mikromolar) hinzugegeben, von welchen eines als Substrat für Hsp70 geeignet ist (NRL-Peptid; CFL-TTDS-NRLLLTG), das zweite von Hsp70 jedoch nicht gebunden werden kann (KTR-Peptid; CFL-TTDS-NRNNNTG), oder die Zellen lediglich mit Dimethylsulfoxid in den Peptid-Lösungen entsprechender Konzentration versetzt (DMSO). Nach unterschiedlichen Inkubationsperioden (4,0 °C, 20 bis 120 Minuten) wurden die Zellen lysiert, die Gesamtproteingehalte angeglichen und die Fluoreszenzintensitäten der Lysate mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes gemessen. Die Säulendiagramme zeigen die relativen Fluoreszenzintensitätswerte, zur besseren Vergleichbarkeit sind die entsprechenden Zahlenwerte oberhalb der einzelnen Balken nochmals angegeben (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen; n = 4).

Obleich die Differenzen der Fluoreszenzintensitäten bei Inkubation mit NRL- oder KTR-Peptiden nur gering ausgeprägt waren, wurde im Rahmen weiterer Experimente versucht,

die Lokalisation der Peptide auf unpermeabilisierten Zellen mittels fluoreszenzmikroskopischer Methoden zu visualisieren. Hierzu wurden die Zellen wie zuvor beschrieben vor der Präparation bei 4,0 °C vorinkubiert, die Peptide hinzugegeben und die Inkubation für 80 Minuten fortgesetzt. Um zu prüfen, ob die Peptide von den Zellen aufgenommen werden können, wurde die Analyse auf durchgängig bei 37 °C inkubierte Zellen ausgedehnt.



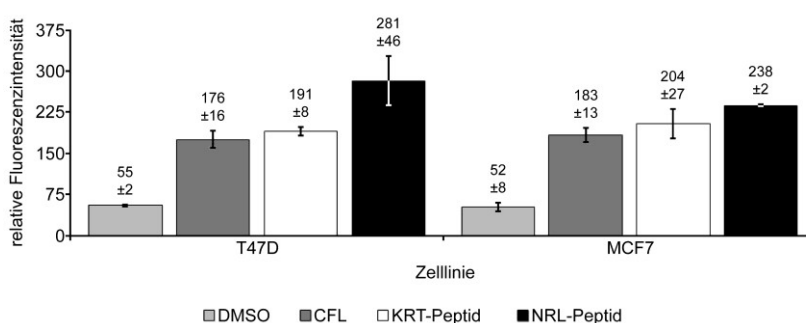
**Abbildung 4.15: Fluorochrom-gekoppelte Substrat- und Kontrollpeptide sind auf den Oberflächen von Mamakarzinom-Zellen detektierbar.** T47D- und MCF7-Zellen wurden nach Kultivierung (37 °C, 72 Stunden) mit Medium inkubiert, welches mit 5(6)-Carboxyfluorescein gekoppelte NRL- beziehungsweise Substratpeptide (B) oder KTR- beziehungsweise Kontrollpeptide (C) enthielt (jeweils in 10,4 mikromolar Konzentration; grün). Die Inkubation erfolgte entweder durchgehend unter physiologischen Bedingungen (37 °C, 80 Minuten), oder nach einer Vorinkubationsphase (4,0 °C, 30 Minuten) bei geringer Temperatur (4,0 °C, 80 Minuten). Zum Vergleich wurde Zellen in Medium mit Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration inkubiert, welche jener der Peptid-Lösungen entsprach. Auf diesen Zellen wurde Hsp70 (rot) ohne vorhergehende Permeabilisierung mittels des monoklonalen Antikörpers sc-59569 indirekt immunfluoreszenzmarkiert (A). Dargestellt sind die mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica TCS SP2, 40-fach Ölimmersionsobjektiv) aufgenommenen Bilder der entsprechenden Detektionskanäle. Maßstab: 50 µm.

Nach Fixierung der Zellen wurden die resultierenden Präparate mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops analysiert. Um gegebenenfalls entsprechende Lokalisationsmuster vergleichen zu können, wurden auch Zellen in die Analyse einbezogen, deren Vorbereitung ohne Zugabe der Peptide erfolgte, bei welchen jedoch Hsp70 unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers sc-59569 indirekt immunfluoreszenzmarkiert worden war. Wie Abbildung 4.15 zeigt, wurden beide Peptide bei Inkubation unter physiologischen Bedingungen von den MCF7- und den T47D-Zellen aufgenommen. Die Fluoreszenzsignale waren hierbei jeweils auf die zytosolischen Bereiche der Zellinnenräume beschränkt und erschienen meist punktförmig beziehungsweise körnig, wobei insbesondere bei den MCF7-Zellen auch größere, vesikuläre Strukturen erkennbar waren. Im Gegensatz hierzu waren im Falle der bei 4,0 °C inkubierten Zellen nur extrem schwache, punktförmig erscheinende und relativ weiträumig verteilte Fluoreszenzsignale detektierbar. Die Lokalisationsmuster und Fluoreszenzintensitäten von NRL- und KTR-Peptiden unterschieden sich nicht signifikant. Dies deutete darauf hin, dass beide Peptide mit Komponenten der Plasmamembran interagieren könnten. Auch waren lokale Akkumulationen von Fluoreszenzsignalen in Bereichen, welche in Form und Größe den Hsp70-Clustern entsprachen, nicht zu beobachten. Letzteres ließ vermuten, dass das auf den Oberflächen der T47D- und MCF7-Zellen exponierte Hsp70 nicht in der Lage war, das NRL-Peptid zu binden.

Da aufgrund der vergleichsweise weiträumigen Verteilung der punktförmigen Peptid-Signale davon ausgegangen werden musste, dass Kollokalisierungen von Peptiden und Hsp70 zwangsläufig auftreten müssten, jedoch zufällige Ereignisse darstellen würden, wurde versucht, Peptid-Konzentrationen und Zelldichten zu variieren. Hierbei zeigte sich jedoch bei hoher Zelldichte bereits nach fünfminütiger Inkubation mit Peptiden in 10,4 mikromolarer Konzentration, dass sich die Zellen deutlich wahrnehmbar gelblich oder bräunlich verfärbten. Daher musste die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Interaktion der Peptide mit der Zellmembranen nicht durch die Aminosäurenanteile, sondern durch die Fluorochrome vermittelt wurden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Zellen wie zuvor beschrieben kultiviert, bei 4,0 °C für 80 Minuten mit NRL- und KTR-Peptiden sowie reinem CFL inkubiert und die Fluoreszenzintensitäten der lebenden, unpräparierten Zellen mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes gemessen.

Wie Abbildung 4.16 zeigt, unterschieden sich die Fluoreszenzintensitäten von KTR-Peptiden und reinem CFL bei beiden Zelllinien nicht signifikant. Im Falle der NRL-Peptide lagen die Intensitäten nur bei den T47D-Zellen sowohl über denen der KTR-Peptide, als auch über denen des reinen CFL ( $90 \pm 54$  beziehungsweise  $105 \pm 62$  relative

Fluoreszenzeinheiten). Bei den MCF7-Zellen hingegen lagen die Intensitäten im Falle der NRL-Peptide zwar geringfügig über denen des CFL ( $55 \pm 15$  relativen Fluoreszenzeinheiten), unterschieden sich aber nicht signifikant von denen der KTR-Peptide. Somit konnte gefolgert werden, dass der überwiegende Teil der ohnehin schwachen Fluoreszenzsignale, die im Rahmen der fluoreszenzmikroskopischen Analyse detektiert worden waren (vergleiche Abbildung 4.15), tatsächlich nicht auf eine Interaktion der Aminosäurenanteile, sondern der Fluorochrome mit Komponenten der Zellmembranen zurückzuführen waren.



**Abbildung 4.16: Mit 5(6)-Carboxyfluorescein gekoppelte Substrat- und Kontrollpeptide sowie das Fluorochrom selbst interagieren mit Komponenten der Plasmamembran von Mamakarzinom-Zellen.**

Ungestresste T47D- und MCF7-Zellen wurden nach der Aussaat für 72 Stunden bei 37 °C auf Deckgläsern kultiviert. Nach Vorinkubation bei geringer Temperatur (4,0 °C, 30 Minuten) wurden ungekoppeltes 5(6)-Carboxyfluorescein (CFL) oder mit diesem gekoppelte Substrat- (NRL-Peptid) beziehungsweise Kontrollpeptide (KTR-Peptid) in 10,4 mikromolarer Konzentration hinzugegeben oder das Nährmedium lediglich mit Dimethylsulfoxid (DMSO) in den Peptid-Lösungen entsprechender Konzentration versetzt. Nach einer weiteren Inkubationsphase (4,0 °C, 80 Minuten) wurden die überschüssige Peptide beziehungsweise Fluorochrome entfernt, die Deckgläser in die mit Phosphat-gepufferter Salzlösung gefüllten Vertiefungen unbenutzter Mikrotiterplatten transferiert und die Fluoreszenzintensitäten der Zellen mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes bestimmt. Die Säulendiagramme zeigen die gemessenen relativen Fluoreszenzintensitätswerte, zur besseren Vergleichbarkeit sind die entsprechenden Zahlenwerte oberhalb der einzelnen Säulen nochmals aufgeführt (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen;  $n = 4$ ).

Insgesamt betrachtet musste somit davon ausgegangen werden, dass weder das auf den Zelloberflächen exponierte integrale, noch das periphere Hsp70 die NRL-Peptide gebunden hatten. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Hsp70 Substratpeptide der genutzten Sequenz grundsätzlich binden kann (Ricci und Williams, 2008), wobei die Hydrolyse von Adenosintriphosphat nur für die Chaperon-Funktion erforderlich ist, ließ dies vermuten, dass das auf den Tumorzellen exponierte Hsp70 nicht aktiv ist. Dementsprechend musste gefolgert werden, dass die hier verwendeten Substratpeptide zur selektiven Markierung des auf den extraplasmatischen Seiten der Plasmamembranen von Tumorzellen exponierten Hsp70 nicht geeignet sind.

## 5 Diskussion

Tumorzellen exprimieren HSPA1A und HSPA1B (nachfolgend zusammenfassend als "Hsp70" bezeichnet) konstitutiv, obgleich eine nennenswerte Expression dieser Hitzeschockproteine bei gesunden Zellen gemeinhin der Stressinduzierung bedarf (Ciocca und Calderwood, 2005; Calderwood *et al.*, 2006). Darüber hinaus exponieren entdifferenzierte Zellen die ursprünglich als zytosolisch und kernständig lokalisiert beschriebenen Chaperone als periphere, Rezeptor-gebundene oder integrale Membranproteine auf den extraplastischen Seiten der Zellmembranen. Hsp70 in Form integraler Proteine der Plasmamembran wurde bislang nur bei Tumorzellen beobachtet und fungiert unter anderem als Erkennungsstruktur für natürliche Killerzellen (Multhoff *et al.*, 1995; Multhoff und Hightower, 2011). Allerdings können sich Tumorzellen etwa bezüglich der Mengen von zytosolischem und integralem Hsp70 deutlich unterscheiden. Beispielsweise enthalten die Plasmamembranen von humanen Brust-Adenokarzinom-Zellen der Zelllinie MCF7 mehr integrales Hsp70, als die der Brust-Duktalkarzinom-Zelllinie T47D (Gehrmann *et al.*, 2014). Daher wurden die genannten Mammakarzinom-Zelllinien und die Osteosarkom-Zelllinie U2OS bezüglich basalem Expressionsniveau, zeitlichem Verlauf und Ausprägung der Stressantwort sowie subzellulärer Lokalisation von Hsp70 detailliert charakterisiert. Hierdurch sollten Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Tumorzelllinien identifiziert werden, die sich als Ansatzpunkte für Tumordiagnostik und Tumorthherapie eignen könnten.

### 5.1 Bei T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen ist die Stärke der Hsp70-Stressantwort abhängig vom basalen Hsp70-Expressionsniveau

Hsp70 wird von gesunden Zellen unter physiologischen Bedingungen entweder nur in geringen Mengen oder nur vergleichsweise kurzfristig exprimiert, etwa während der Synthesephase des Zellzyklus (Milarski und Morimoto, 1986). Werden die Zellen Stressfaktoren wie etwa Hitze ausgesetzt, reagieren sie im Rahmen der Stressantwort mit einer Steigerung der Expression von Hsp70 und anderen Stressproteinen (Daugaard *et al.*, 2007). Die besondere Bedeutung von Hsp70 für die Stressantwort resultiert aus der Tatsache, dass dieses Chaperon nicht nur einzelne Substratproteine vor stressinduzierten Fehlfaltungen schützen, sondern auch bereits vorhandene Proteinaggregate auflösen und stressinduzierte Apoptose unterbinden kann (Mosser und Morimoto, 2004; Nillegoda *et al.*, 2015).

Im Gegensatz zu gesunden Zellen sind tumorigene Zellen aufgrund ihres unkontrollierten Wachstums ständig mit externen Stressfaktoren wie Hypoxie und Azidose, aber auch Nährstoff- und Metabolitenmangel konfrontiert (Taddei *et al.*, 2013). Darüber hinaus müs-

sen sie interne Stressfaktoren nivellieren, etwa aufgrund von Mutationen akkumulierende fehlgefaltete Proteine oder deregulierte Signalwege (Luo *et al.*, 2009). Daher sind viele dieser dauerhaft gestressten Zellen auf die konstitutive Expression von Stressproteinen und insbesondere von Hsp70 angewiesen. Die basalen Expressionsniveaus der Chaperone können jedoch zwischen unterschiedlichen Geweben beziehungsweise Zelltypen variieren (Flanagan *et al.*, 1995; Faure *et al.*, 2004; Cai *et al.*, 2012b).

Wie die Ergebnisse der biochemischen Analysen zeigten, exprimierten auch die T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen Hsp70 bereits unter physiologischen Bedingungen. Auffallend war hierbei, dass die beiden Mammakarzinom-Zelllinien im Vergleich zu den Osteosarkom-Zellen deutlich höhere basale Expressionsniveaus aufwiesen (Abbildung 4.2; T47D: 100 %; MCF7:  $70 \pm 3$  %; U2OS:  $37 \pm 19$  %). Letzteres legt auf den ersten Blick einen Zusammenhang zwischen Tumorzelltyp und basaler Hsp70-Expressionsintensität nahe. Jedoch muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass diese Abweichungen lediglich auf unterschiedliche Tumorgenesefaktoren und dementsprechend auf unterschiedliche Entdifferenzierungsgrade der Zellen zurückzuführen sind. Da es diesbezüglich an vergleichenden Studien mangelt, kann eine Korrelation zwischen basalem Hsp70-Expressionsniveau und Tumorzelltyp somit lediglich vermutet werden.

Bei gesunden Zellen wie auch bei Tumorzellen kann es nach Stressexposition - je nach Stressfaktor, Stressintensität, Zelltyp, Kompartiment und betrachtetem Protein - während der Rekonvaleszenzphase Stunden oder Tage dauern, bis die basalen Expressionsniveaus wieder erreicht werden (Parsell und Lindquist, 1994). Interessanterweise kann es während dieser Phase zu einem als induzierte oder erworbene Stresstoleranz bezeichneten Phänomen kommen. Hierbei zeigen sich Zellen, aufgrund der noch erhöhten Expressionsniveaus diverser Stressproteine, bei erneuter Exposition auch gegenüber Stressintensitäten resistent, die andernfalls letal wirken würden (Parsell und Lindquist, 1994).

Die Expression von Hsp70 ist nur einer von mehreren die Stressresistenz bestimmenden Faktoren. Jedoch wird angenommen, dass das Maß der Stresstoleranz einer Zelle im Allgemeinen mit der Menge des exprimierten Hsp70 korreliert (Nollen *et al.*, 1999). Daher ließen bereits die beschriebenen unterschiedlichen basalen Hsp70-Expressionsniveaus der drei untersuchten Tumorzelllinien vermuten, dass sich diese auch bezüglich der Intensitäten der Hsp70-Expressionssteigerungen nach Stressexposition unterscheiden würden. Wie die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung der Hsp70-Stressantworten zeigten, war dies tatsächlich der Fall: Je mehr Hsp70 die Zellen unter physiologischen Bedingungen exprimierten, desto schwächer fiel die Hsp70-Stressantwort aus (Abbildung 4.5; T47D:

+108 ± 26 %; MCF7: +380 ± 46 %; U2OS: +1667 ± 169 %). Dies zeigt anschaulich, dass die Intensität der Hsp70-Stressantwort unmittelbar vom basalen Hsp70-Expressionsniveau abhängt. Unter Berücksichtigung des Phänomens der induzierten Stresstoleranz liegt darüber hinaus - bei oberflächlicher Betrachtung - die Vermutung nahe, dass Tumorzelltypen, die unter physiologischen Bedingungen größere Mengen Hsp70 exprimieren, im Vergleich zu Zellen mit schwächerer basaler Expression über eine höhere Stresstoleranz verfügen könnten. Daher ist es denkbar, dass die T47D-Zellen aufgrund ihres vergleichsweise hohen basalen Hsp70-Expressionsniveaus nur eine geringfügige Erhöhung der Expression benötigen könnten, um die negativen Effekte der Stressexposition auszugleichen. Diesbezüglich müssen jedoch weitere Einflussfaktoren berücksichtigt werden.

Derzeit ist nicht bekannt, ob die Stresstoleranz von Tumorzellen allgemein stärker ausgeprägt ist als jene der korrespondierenden gesunden Zellen. Die Notwendigkeit der Hsp70-Expression ist hingegen ein gut dokumentiertes Phänomen. So wirkt eine erzwungene Reduzierung der Expression, etwa mittels Hsp70-spezifischer Antisense-Ribonukleinsäuren oder -Desoxyribonukleinsäuren, bei Tumorzellen generell Apoptose-fördernd (Kaur und Ralhan, 2000; Nylandsted *et al.*, 2000). Somit ist es vorstellbar, dass das basale Hsp70-Expressionsniveau mit dem Entdifferenzierungsgrad der Zellen in Zusammenhang steht. Die T47D-Zellen könnten also bereits unter physiologischen Bedingungen vergleichsweise große Mengen der Chaperone zwingend benötigen, aber nicht in der Lage sein, die Hsp70-Expression über ein bestimmtes Maß hinaus zu steigern.

Für letztgenannte Hypothese spricht, dass sich die Hsp70 allgemein zugeschriebene globale zytoprotektive Wirkung nur ansatzweise bestätigen ließ. So waren nur bei den T47D-Zellen, also den Zellen mit dem höchsten basalen Hsp70-Expressionsniveau, keine signifikanten stressinduzierten Schwankungen der Expression des Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) feststellbar (Abbildung 4.4 C). Die Expression beispielsweise der Proteine Alix und Galektin-3 hingegen wurde auch bei diesen Zellen durch den Hitzeschock beeinflusst (Abbildungen 4.4 A und 4.4 B).

## **5.2 Die Ausprägung der Hsc70-Stressantwort ist bei T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen abhängig vom basalen Hsp70-Expressionsniveau**

Interessanterweise zeigte die Tumorzelllinie T47D auch bezüglich der stressinduzierten Schwankungen der Expression von HSPA8 (nach der englischen Bezeichnung "*Heat Shock Cognate 71 kDa Protein*" nachfolgend als "Hsc70" bezeichnet) einige Besonderheiten. So exprimierten diese Zellen bereits unter physiologischen Bedingungen vergleichs-

weise wenig Hsc70 (Abbildung 4.2; T47D:  $33 \pm 9,0 \%$ ; MCF7:  $100 \%$ ; U2OS  $30 \pm 10 \%$ ). Trotzdem reduzierten die T47D-Zellen die Expression von Hsc70 nach Stressexposition geringfügig, während die MCF7- und U2OS-Zellen die Synthese verstärkten (Abbildung 4.4 D; T47D:  $-49 \pm 12 \%$ ; MCF7:  $+68 \pm 17 \%$ ; U2OS:  $+32 \pm 10 \%$ ).

Im Gegensatz zu Hsp70 ist über die Bedeutung von Hsc70, eines konstitutiv exprimierten Vertreters der HSP70-Familie, insbesondere für die Tumorviabilität nur wenig bekannt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass Hsc70 von Tumorzellen oftmals überexprimiert wird und eine Beeinflussung der Expression durch Stressfaktoren wie beispielsweise thermischen Stress durchaus möglich ist (Maeda *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2012). Die bei den T47D-Zellen beobachtete Reduzierung der Hsc70-Expression stellt insofern eine Besonderheit dar, als dass ein solcher Effekt im Zusammenhang mit einem Hitzeschock bislang nicht beschrieben wurde. Allerdings muss diesbezüglich auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass diese Zellen infolge der Stressexposition nicht die Expression von Hsc70 reduzierten, sondern lediglich den Export desselben intensivierten.

Bei der Beurteilung von Hsp70- und Hsc70-Expressionsänderungen auf Proteinebene wird vielfach außer Acht gelassen, dass diverse Tumorzelltypen neben anderen Proteinen auch Hsp70 und Hsc70 beständig exportieren. Aufgrund des derzeitigen Standes der Forschung kommen im Wesentlichen zwei Möglichkeiten der Externalisierung in Frage. Zum einen lassen die Ergebnisse verschiedener Studien vermuten, dass die Chaperone von Tumorzellen in freier Form sekretiert werden, wobei die Sekretionsrate nach Stressexposition ansteigen kann (Barreto *et al.*, 2003; Mambula und Calderwood, 2006; Nirdé *et al.*, 2010). Zum anderen ist bekannt, dass Hsp70 und Hsc70 in und auf einigen Typen extrazellulärer Vesikel (EVs) exportiert werden. Zu diesen zählen etwa als Exosomen bezeichnete EVs, deren Freisetzung durch Verschmelzung multivesikulärer, später Endosomen (nach der englischen Bezeichnung "*Multivesicular Bodies*" nachfolgend als "MVBs" bezeichnet) mit der Plasmamembran erfolgt (vereinfachend werden EVs endosomaler Herkunft gemäß der englischen Bezeichnung "*Tumor-derived Microvesicles*" nachfolgend mit "TMVs" abgekürzt). Die mit Durchmessern von bis zu 100 Nanometern relativ kleinen TMVs enthalten oftmals Hsp70 und Hsc70, auch deren Freisetzung kann stressinduziert intensiviert werden (Chen *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011; Raposo und Stoorvogel, 2013).

Interessanterweise wurde bei einigen B-Lymphoblastoid-Zelllinien beobachtet, dass infolge eines Hitzeschocks die Konzentration des zellulären Hsc70 sinkt, während die Konzentration des in den TMVs enthaltenen Hsc70 ansteigt (Clayton *et al.*, 2005). Dementsprechend ist es denkbar, dass bei den T47D-Zellen die Hsc70-Expression nach Stressexpositi-



on tatsächlich konstant blieb oder geringfügig intensiviert wurde. Eine verstärkte Sekretion von TMVs oder einer Erhöhung der Konzentration des in diesen enthaltenen Hsc70 wäre mit dem gewählten methodischen Ansatz jedoch nicht direkt erkennbar. Allerdings kann aufgrund der genutzten Fraktionierungsmethode davon ausgegangen werden, dass nur die Membranfraktionen MVBs beziehungsweise exosomale Proteine enthielten. Bei einem stressinduziert verstärkten Export von exosomalem Hsc70 wären demnach Änderungen der Verhältnisse von zytosolischem zu Membran-assoziiertem oder in subzellulären Kompartimenten enthaltenem Hsc70 zu erwarten gewesen. Es hätte also eine Erhöhung der Hsc70-Konzentration in den Membranfraktionen auftreten müssen. Da dies bei den T47D-Zellen jedoch nicht der Fall war (vergleiche Abbildungen 4.3 und 4.4), scheint ein verstärkter Verlust von Hsc70 durch eine stressinduzierte Intensivierung der TMV-Sekretion unwahrscheinlich. Demgegenüber kann eine Erhöhung der Sekretion von freiem Hsc70 infolge der Stressexposition nicht ausgeschlossen werden. Doch auch in diesem Falle bliebe fraglich, warum dies nur bei den T47D-Zellen zu einer Verminderung der Konzentration von Hsc70 in Zytosol- und Membranfraktionen geführt haben sollte.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die stressinduzierte Verringerung der Konzentration beziehungsweise Expression von Hsc70 ergibt sich aus dem hohen basalen Hsp70-Expressionsniveau der T47D-Zellen. So konnten Dressel *et al.* mittels eines konditionalen Expressionssystems demonstrieren, dass bei Tumorzellen im Falle einer permanenten Überexpression von Hsp70 eine Verminderung der Hsc70-Expression auf posttranskriptioneller Ebene erfolgt. Darüber hinaus zeigten die Autoren, dass hierbei physiologische Funktionen von Hsc70 durch Hsp70 übernommen werden (Dressel *et al.*, 2003). Derartiges konnte bei einer kurzfristigen Hsp70-Expressionssteigerung, etwa infolge eines Hitzeschocks, nicht beobachtet werden. Daher spekulierten die Autoren, es könne für die Zellen eventuell einfacher sein, die endogene Expression von Hsc70 kontrollieren, denn die exogene Expression von Hsp70. Darauf basierend postulierten Dressel *et al.* einen nur durch dauerhafte Überexpression von Hsp70 ausgelösten kompensatorischen Adaptionvorgang des zellulären Chaperon-Netzwerkes. Jedoch ist es denkbar, dass im Falle der T47D-Zellen bereits die kurzfristige Stressexposition einen ähnlichen Effekt ausgelöst hat.

Für die Beurteilung der Hsc70- beziehungsweise Hsp70-Expressionsschwankungen bei den T47D-Zellen muss weiterhin berücksichtigt werden, dass Chaperone der HSP70-Familie nicht nur zytoprotektive, sondern auch zytotoxische Wirkungen entfalten können. Im Falle von Hsp70 sind Apoptose-fördernde Effekte vergleichsweise gut dokumentiert. So steigert eine Überexpression von Hsp70 beispielsweise bei immortalisierten Jurkat-T-

Zellen und auch bei Hela-Zervixkarzinom-Zellen deren Anfälligkeit für durch Tumornekrosefaktor-Rezeptoren vermittelte Apoptose (Liossis *et al.*, 1997; Ran *et al.*, 2004). Hierbei bindet Hsp70 eine Domäne der Gamma-Untereinheit des I-Kappa-B-Kinase- (IKK-) Komplexes, wodurch dessen Funktion gestört und dadurch IKK-abhängige antiapoptotische Transkriptionsfaktoren inhibiert werden.

Für Hsc70 sind negative Auswirkungen einer Überexpression im Detail nicht beschrieben. Allerdings binden Hsc70 und Hsp70 ähnliche Aminosäuresequenzen, auch können diverse die Substratspezifität vermittelnde Ko-Chaperone respektive J-Proteine mit beiden Chaperonen interagieren (Pandya *et al.*, 2009; Young, 2014). Daher scheint es plausibel, zytotoxische Effekte auch im Falle einer Überexpression von Hsc70 vorauszusetzen. Somit ist es denkbar, dass die T47D-Zellen trotz ihres hohen basalen Hsp70-Expressionsniveaus die Hsp70-Stressantwort nicht unterlaufen können und mögliche negative Effekte der stressinduzierten Hsp70-Expressionssteigerung durch eine Reduzierung der Hsc70-Expression ausgleichen müssen. Nichtsdestotrotz kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass die T47D-Zellen im Vergleich zu den MCF7- und U2OS-Zellen lediglich über eine höhere basale Stresstoleranz verfügen und daher die Hsp70-Expression bei vergleichbarer Stressintensität nur geringfügig steigern müssen.

Unabhängig davon, welche der letztgenannten Hypothesen zutreffend ist, lassen die beschriebenen Ergebnisse der biochemischen Analysen darauf schließen, dass bei Tumorzellen die Intensitäten der Hsp70- und Hsc70-Stressantworten vom basalen Expressionsniveau von Hsp70 abhängen. Darüber hinaus kann vermutet werden, dass die maximal exprimierbaren Mengen beider Chaperone begrenzt sind. Die Beobachtung, dass MCF7- und U2OS-Zellen, welche ein im Vergleich zu den T47D-Zellen geringeres basales Hsp70-Expressionsniveau aufwiesen, nach Stressexposition die Expression von Hsp70 und Hsc70 steigerten, untermauert diese Hypothese (vergleiche Abbildungen 4.4 D und 4.5).

### **5.3 Bei T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen ist der zeitliche Verlauf der Hsp70-Stressantwort unabhängig vom basalen Expressionsniveau**

Die bislang beschriebenen Ergebnisse der biochemischen Analysen illustrieren anschaulich die sich aufgrund von Herkunft und Entdifferenzierungsgrad ergebenden Unterschiede zwischen den Zelllinien sowie die Schwierigkeiten, die sich infolge der heterogenen Literaturlage bei der Interpretation der gewonnenen Daten zwangsläufig ergeben. Trotz dieser Unterschiede wiesen die drei Tumorzelllinien jedoch auch auffällige Gemeinsamkeiten auf. So verliefen die durch einen Hitzeschock induzierten Expressionsschwankungen von

Hsp70 in den Zytosol- und Membranfraktionen aller drei untersuchten Zelllinien stets vergleichbar. Auch die Verhältnisse von zytosolischem zu Membran-assoziiertem oder in subzellulären Kompartimenten enthaltenem Hsp70 änderten sich nur bei den T47D-Zellen und dies auch nur sehr geringfügig (Abbildung 4.3). Darüber hinaus erreichten die Hsp70-Expressionssteigerungen die jeweiligen Maxima bei T47D- sowie MCF7- und U2OS-Zellen zwischen vier und sechs Stunden nach Stressexposition (Abbildung 4.5). Auch die während der Rekonvaleszenzphase zwischen sechs und 24 Stunden auftretenden Expressionsreduktionsraten waren bei allen drei Tumorzelllinien auffallend ähnlich ausgeprägt (T47D:  $-43 \pm 12 \%$ ; MCF7:  $-48 \pm 14 \%$ ; U2OS:  $-36 \pm 10 \%$ ).

Zusammenfassend betrachtet zeigt Letzteres klar, dass zumindest im Falle der drei untersuchten Tumorzelllinien der zeitliche Verlauf der Hsp70-Stressantwort unabhängig vom basalen Hsp70-Expressionsniveau ist. Andererseits lassen die ähnlichen Expressionsreduktionsraten vermuten, dass die Hsp70-Menge, welche pro Zeiteinheit beispielsweise durch lysosomale Degradation wiederverwertet beziehungsweise direkt oder EV-abhängig exportiert werden kann, unabhängig von den basalen Hsp70-Expressionsniveaus der Zellen und auch von deren stressinduzierten Hsp70-Expressionssteigerungsraten ist.

#### **5.4 Die subzelluläre Lokalisation von Hsp70 wird bei T47D-, MCF7- und U2OS-Tumorzellen durch einen Hitzeschock nicht beeinflusst**

Wie allgemein bekannt, wird die Expression von Hsp70 im Rahmen der zellulären Stressantwort stark erhöht. Hierbei erfolgt die Synthese zwar im Zytosol. Für gewöhnlich akkumulieren die Chaperone jedoch unmittelbar im Anschluss in Zellkernen und Nukleoli, wobei der für die Akkumulation erforderliche Zeitraum je nach Zelllinie und Stressintensität variieren kann (Kose und Imamoto, 2014). Der Translokationsablauf und die daran beteiligten Proteine sind bislang nur oberflächlich charakterisiert, jedoch konnten bereits einige Funktionen des kernständigen Hsp70 identifiziert werden. So ist dieses beispielsweise an Mechanismen beteiligt, die dem Schutz oder der Wiederherstellung der Integrität karyoplasmatischer oder ribosomaler Nukleinsäuren dienen (Kotoglou *et al.*, 2009).

Der Prozess der stressinduzierten Translokation von Hsp70 wurde beispielsweise von Kotoglou *et al.* in permeabilisierten HeLa-Zervixkarzinom-Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz visualisiert. Die Autoren demonstrierten, dass Hsp70 in den ungestressten HeLa-Zellen überwiegend zytosolisch lokalisiert ist, die Expression nach Stressexposition stark ansteigt und die Chaperone in Zellkernen sowie Nukleoli akkumulieren (Kotoglou *et al.*, 2009). Im Gegensatz hierzu zeigten die Ergebnisse der eigenen immunfluoreszenz-

mikroskopischen Analysen ungestresster und gestresster T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen ein gänzlich anderes Bild (vergleiche Abbildung 4.8 und Anhang, Abbildung 9.6). Innerhalb der T47D- und MCF7-Mammakarzinom-Zellen erschien Hsp70 völlig gleichmäßig verteilt. Eine stressinduzierte Akkumulation von kernständigem Hsp70 trat bei diesen Zelllinien nicht auf. Demgegenüber war im Falle der ungestressten U2OS-Osteosarkom-Zellen der Anteil des zytosolischen Hsp70 geringfügig höher als jener der kernständigen Chaperone. Darüber hinaus nahm bei letzteren Zellen die Menge des kernständigen Hsp70 nach Stressexposition zu, jedoch nur zu einem so geringen Teil, dass die Verteilung der Chaperone im gesamten Zellinnenraum gleichmäßig erschien. Eine Konzentration von Hsp70 im Bereich der Nukleoli war bei keiner der drei Tumorzelllinien zu beobachten. Als mögliche Ursache hierfür wurde zunächst die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die Hsp70-Stressantwort durch unterschiedliche Zelldichten beeinflusst werden könnte.

Im Fall von Hsc70 ist bekannt, dass sowohl die subzelluläre Lokalisation als auch die stressinduzierte nukleäre Akkumulation von der Zelldichte abhängen können (Chu *et al.*, 2001). So ist Hsc70 bei HeLa-Kulturen geringerer Dichten innerhalb der Zellen überwiegend gleichmäßig verteilt, akkumuliert nach einem Hitzeschock jedoch in den Zellkernen. Bei konfluenten HeLa-Kulturen hingegen ist das konstitutiv exprimierte Chaperon überwiegend zytosolisch lokalisiert, eine stressinduzierte Akkumulation von kernständigem Hsc70 tritt bei solchen Kulturen nicht auf. Chu *et al.* visualisierten diesen Zusammenhang unter anderem mittels indirekter Immunfluoreszenz, wobei für die Präparation der Zellen eine dem eigenen experimentellen Ansatz entsprechende Methode genutzt wurde (Fixierung mittels Paraformaldehyd, Permeabilisierung mittels Triton X-100).

Im Gegensatz zu den für Hsc70 beschriebenen Lokalisationsmustern ließ ein Vergleich der Verteilung von Hsp70 bei T47D-, MCF7- und U2OS-Kulturen verschiedener Zelldichten keine Unterschiede erkennen (vergleiche Abbildung 4.8 und Anhang, Abbildung 9.6). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die subzelluläre Lokalisation von Hsp70 zumindest im Falle der drei letztgenannten Tumorzelllinien nicht von der Zelldichte abhängig ist. Ferner gelang es nicht, die von Kotoglou *et al.* im Falle der HeLa-Zellen gezeigte und aufgrund der Ergebnisse der eigenen biochemischen Analysen erwartete Steigerung der Hsp70-Expression nach Stressexposition mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden zu visualisieren oder quantitativ zu erfassen (vergleiche Abbildungen 4.5 und 4.8 sowie Anhang, Abbildungen 9.5 und 9.6). Weder bei den permeabilisierten noch bei den unpermeabilisierten Proben der T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen konnte eine signifikante Zunahme der Hsp70-Signalintensitäten acht Stunden nach einem Hitzeschock festgestellt werden.

Letzteres dürfte im Wesentlichen auf die methodischen Einschränkungen zurückzuführen sein, welche die Möglichkeiten der Immunfluoreszenzmikroskopie im Allgemeinen begrenzen. So erfolgten die biochemischen Analysen exklusive der Zellkerne und damit der kernständigen Proteine. Dies ließ sich im Falle der fluoreszenzmikroskopischen Analysen jedoch nicht umsetzen. Des Weiteren unterschieden sich die Ausdehnungen der Zellen entlang der Z-Achse bisweilen so stark voneinander, dass die optimalen Fokusebenen teilweise extrem variierten. Auch ließen sich insbesondere die T47D- und MCF7-Zellen nur schwer vereinzeln. Daher konnten einzelne Zellen oftmals nicht eindeutig voneinander abgegrenzt werden, was die Quantifizierung deutlich erschwerte.

Prinzipiell muss in diesem Zusammenhang auch eine artifizielle Umverteilung beziehungsweise differentielle Extraktion von Proteinen aus subzellulären Kompartimenten infolge von Fixierung und Permeabilisierung als mögliche Fehlerquelle berücksichtigt werden. Derartige Artefakte können etwa auftreten, wenn Paraformaldehyd-fixierte Zellen mit Triton X-100 permeabilisiert werden (Melan und Sluder, 1992), wie im Rahmen der eigenen Experimente sowie von Chu *et al.* praktiziert. Dies gilt auch für die von Kotoglou *et al.* durchgeführte Permeabilisierung von Paraformaldehyd-fixierten Zellen mit Methanol (Schnell *et al.*, 2012). Allerdings wurde die stressinduzierte nukleäre Akkumulation von Hsp70 bei HeLa-Zellen von anderen Autoren auch beispielsweise durch Expression fluoreszierender Fusionsproteine visualisiert (Zeng *et al.*, 2004).

Gegen das Vorliegen von Fixations- beziehungsweise Permeabilisierungsartefakten im Falle der eigenen Ergebnisse spricht, dass bei ungestressten HeLa-Zellen, die zu Vergleichswecken analog zu den T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen präpariert und analysiert wurden, kaum kernständiges Hsp70 zu beobachten war (Anhang, Abbildung 9.12 A). Darüber hinaus war Hsc70 bei ungestressten U2OS-Kulturen geringer Zelldichte zwar im zytosolischen Bereich der Zellen detektierbar, nicht jedoch innerhalb der Zellkerne (Anhang, Abbildung 9.12 B). Dementsprechend kann zwar nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, dass durch die genutzte Präparationsmethode geringfügige artifizielle Umverteilungen oder differentielle Extraktionen von Zielproteinen ausgelöst wurden. Wahrscheinlicher ist indes, dass die dargestellten Diskrepanzen zwischen den im Falle der HeLa-Zellen publizierten Daten und den dargestellten eigenen Ergebnissen aus der unterschiedlichen Herkunft der einzelnen Tumorzelllinien resultieren.

Letzteres lässt einerseits darauf schließen, dass bei einer bestimmten Tumorzelllinie gemachten Beobachtungen nicht zwangsläufig auf andere Zelllinien - und insbesondere nicht auf gesunde Zellen - übertragbar sind. Andererseits lassen die beschriebenen Resultate der

immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen jedoch vermuten, dass ein Hitzeschock der genutzten Dauer und Intensität (25 Minuten, 44 °C) auf die Lokalisation des intrazellulären sowie des auf den extraplasmatischen Seiten der Plasmamembranen exponierten Hsp70 bei T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen keinen wesentlichen Einfluss hat.

Interessanterweise nutzten Kotoglou *et al.* für die Stressexposition ebenfalls Wasserbäder, machten über die Zufuhr gasförmigen Kohlenstoffdioxids aber keine Angaben. Die Stressintensität (43,5 °C) war mit der im Rahmen der eigenen Analysen genutzten vergleichbar. Der Expositionszeitraum (90 Minuten) lag erheblich darüber, der Erholungszeitraum (90 Minuten) erheblich darunter. Bedeutsam ist hierbei die im Rahmen eigener Experimente gemachte Beobachtung, dass weder T47D-, noch MCF7- oder U2OS-Zellen einer Stressintensität von 44 °C für 90 Minuten ohne Aufrechterhaltung der für die Kultivierung erforderlichen Kohlenstoffdioxid-Konzentration standhalten. Unter Berücksichtigung der überwiegend gleichmäßigen Verteilung von Hsp70 innerhalb von ungestressten und gestressten Mammakarzinom- sowie Ostersarkom-Zellen liegt daher die Schlussfolgerung nahe, dass es sich bei der im Falle der Zervixkarzinom-Zellen beschriebenen, stressinduzierten Translokation von zytosolischem Hsp70 in Zellkerne nicht um ein generelles Phänomen handelt.

### **5.5 Sowohl integrales als auch peripheres Hsp70 sind auf den Oberflächen von T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen in Clustern lokalisiert**

Bisherige Studien zielten oftmals lediglich darauf ab, Hsp70 auf verschiedenen Tumorzellen nachzuweisen und diese bezüglich der Menge des auf den Oberflächen exponierten Hsp70 zu charakterisieren. So demonstrierten Gehrman *et al.* durchflusszytometrisch, dass T47D-Zellen im Vergleich zu MCF7-Zellen über weniger integrales Hsp70 verfügen und dass T47D-Kulturen einen geringeren prozentualen Anteil von Zellen aufweisen, die integrales Hsp70 exponieren (Gehrman *et al.*, 2014; T47D: 29 %; MCF7: 82 %). Darüber hinaus zeigten die Autoren mittels direkter Immunfluoreszenz, dass das integrale Hsp70 auf murinen 4T1-Mammakarzinom-Zellen nicht gleichmäßig verteilt ist, sondern in räumlich begrenzten Bereichen akkumuliert (vergleiche Abbildung 2.5).

Die Resultate der eigenen immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen entsprachen grundsätzlich den von Gehrman *et al.* beschriebenen Ergebnissen. So war bei Nutzung des monoklonalen Hsp70-Primärantikörpers sc-59569 auf den MCF7-Zellen ein ähnliches Hsp70-Lokalisationsmuster zu beobachten, wie für die 4T1-Zellen beschrieben (Gehrman *et al.*, 2014). Auch der im Vergleich zu den T47D-Zellen höhere Gehalt von integralem Hsp70 der MCF7-Zellen ließ sich visualisieren (Abbildung 4.6). Bei Nutzung letzteren

Primärantikörpers war eine Konzentration von Hsp70 auf eng begrenzte Bereiche der Zelloberfläche nur bei den MCF7-Zellen erkennbar. Auf den T47D- und U2OS-Zellen hingegen schien Hsp70 überwiegend gleichmäßig verteilt zu sein. Demgegenüber zeigten die mittels des polyklonalen Primärantikörpers sc-1060 durchgeführten Untersuchungen eine Akkumulation von Hsp70 in ein bis zwei Clustern auf jeder einzelnen analysierten MCF7-, T47D- und U2OS-Zelle (Abbildung 4.7). Die grundsätzlich sphärisch beziehungsweise globulär erscheinenden Cluster waren überwiegend apikal oder lateral lokalisiert und erreichten Durchmesser von etwa drei Mikrometern auf den MCF7-, aber von bis zu zehn Mikrometern auf den T47D- und U2OS-Zellen. Darüber hinaus unterschieden sich die Intensitäten der Fluoreszenzsignale zwischen den Zelllinien nur geringfügig (vergleiche Abbildungen 4.6 bis 4.8 sowie Anhang, Abbildungen 9.5 und 9.6).

Letzteres steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu den von Gehrmann *et al.* publizierten Ergebnissen. In diesem Zusammenhang muss jedoch berücksichtigt werden, dass der für die Charakterisierung der Menge des auf den Oberflächen der MCF7- und T47D-Zellen exponierten Hsp70 genutzte monoklonale Antikörper cmHsp70.1 spezifisch für das in die Plasmamembran integrierte Hsp70 ist (Multhoff und Hightower, 2011). Das Chaperon kann aber auch als peripheres Membranprotein vorliegen (Mahalka *et al.*, 2014). Da durch polyklonale Antikörper für gewöhnlich mehrere verschiedene Epitope gebunden werden können, lassen die beschriebenen Lokalisationsmuster vermuten, dass der polyklonale Primärantikörper sc-1060 sehr wahrscheinlich sowohl das integrale als auch das periphere Hsp70 bindet. Dementsprechend liegt die Schlussfolgerung nahe, dass Hsp70 auf den Oberflächen der MCF7-Zellen überwiegend als integrales, auf den T47D- und U2OS-Zellen hingegen überwiegend als peripheres Membranprotein vorliegt.

Letzterer Hypothese entspricht auch, dass bei den permeabilisierten T47D- und MCF7-Zellen vereinzelt lokale Akkumulationen von Hsp70 im Bereich der Zellperipherie auftreten (Abbildung 4.8). Diese waren zwar generell deutlich kleiner als die Hsp70-Cluster auf den unpermeabilisierten Zellen, wiesen jedoch eine diesen entsprechende Form auf. Im Gegensatz zur gemeinhin uneinheitlichen optischen Erscheinung zufällig auftretender, unregelmäßiger Ein- oder Ausstülpungen der Zellmembran waren diese Strukturen oftmals rundlich. Somit können diese auch als Akkumulation des gegenüber Detergenzien resistenten integralen Hsp70 interpretiert werden (Vega *et al.*, 2008).

Demgegenüber lässt bereits die Form der Hsp70-Cluster auf den unpermeabilisierten Tumorzellen vermuten, dass es sich bei diesen um EVs handeln könnte, wobei die Größe der Strukturen nur bei oberflächlicher Betrachtung irritiert. Tumorzellen externalisieren nicht

nur Exosomen beziehungsweise TMVs mit Durchmessern im Nanometerbereich, sondern setzten auch wesentlich größere EVs frei (D'Souza-Schorey und Clancy, 2012; Raposo und Stoorvogel, 2013). Im Gegensatz zu TMVs werden solche als Ektosomen, Onkosomen oder Gigantvesikel bezeichnete EVs nicht durch Verschmelzung von MVBs mit der Plasmamembran sekretiert, sondern durch Abschnürung von Bereichen derselben freigesetzt (nach der englischen Bezeichnung "*Shedding Vesicles*" werden nachfolgend alle von der Zellmembran abgeschnürten EVs zusammenfassend als "SVs" bezeichnet). Beispielsweise sondern diverse Prostatatumore und amöboide Tumorzellen SVs ab, die Durchmesser von ein bis zehn Mikrometer erreichen können (Di Vizio *et al.*, 2012).

Im Falle von Mammakarzinomen sowie einiger von diesen abstammender Zelllinien, darunter auch die T47D- und MCF7-Zellen, beschrieben Wright *et al.* die Bildung von EVs, deren Durchmesser die Autoren mit drei bis 42 Mikrometern bezifferten (Wright *et al.*, 2014). Letztgenannte Studie stützt sich jedoch ausschließlich auf mikroskopische Verfahren. Dies ist insoweit auffällig, als dass zur Isolation großer SVs bereits etablierte Protokolle im Wesentlichen auf differentieller Zentrifugation oder Filtration beruhen und die Gewinnung von TMVs und SVs in analysfähiger Form relativ simpel erscheinen lassen (Di Vizio *et al.*, 2012; Morello *et al.*, 2013). Im Rahmen eigener Experimente wurde festgestellt, dass T47D- und MCF7-Zellen an SVs erinnernde Vesikel freisetzen, diese jedoch eine derart starke Tendenz zur Aggregation zeigten, dass die Isolate durchflusszytometrisch nicht analysiert werden konnten. Auch waren vesikuläre Strukturen mit mehreren Dutzend Mikrometern Durchmesser bei T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen zu keinem Zeitpunkt zu beobachten. Dennoch bleibt festzuhalten, dass das Vorhandensein von SVs, deren Größe den beschriebenen Hsp70-Clustern entspricht, nicht ungewöhnlich und wahrscheinlich auch kein besonderes Merkmal amöboider Tumorzellen oder bestimmter Tumortypen ist. Dies stützt wiederum die Hypothese, dass es sich bei den Hsp70-Clustern um in der Abschnürung begriffene oder mit der Plasmamembran verschmelzende SVs handeln könnte. Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse bestätigen diese Hypothese indirekt.

## **5.6 Alix akkumuliert auf den Oberflächen von T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen ausschließlich in der Umgebung der Hsp70-Cluster**

Derzeit wird davon ausgegangen, dass die meisten gesunden Zellen wie auch die überwiegende Anzahl von Tumorzellen beständig EVs externalisiert beziehungsweise internalisiert. Von diesen wird unter anderem vermutet, dass sie der interzellulären Kommunikation dienen (Raposo und Stoorvogel, 2013). Die molekularbiologischen Grundlagen insbeson-



dere der Biogenese von SVs sind bislang nur oberflächlich charakterisiert. Jedoch wird angenommen, dass Abschnürung und Fusion großer SVs von beziehungsweise mit der Plasmamembran extensive Remodellierungsprozesse von Extrazellulärmatrix- und Zelladhäsionskomponenten erfordern (Minciacchi *et al.*, 2015a). In letztgenannte Prozesse involviert ist unter anderem das multifunktionelle Protein Alix. Dieses findet insbesondere als exosomales Markerprotein Verwendung, da es an der Biogenese von TMVs beteiligt und in deren Lumen enthalten ist (Mathivanan *et al.*, 2012). Allerdings demonstrierten Pan *et al.* am Beispiel von WI38-Fibroblasten, dass das auf den Oberflächen dieser Zellen lokalisierte Alix auch in die Regulation der Integrin-vermittelten Zelladhäsion sowie in den Aufbau der extrazellulären Matrix involviert ist (Pan *et al.*, 2008b).

Interessanterweise zeigten die Ergebnisse der eigenen fluoreszenzmikroskopischen Analysen, dass Alix auf den Oberflächen der T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen zwar mit Hsp70 kolokalisierte, dabei jedoch allgemein ein flächigeres Lokalisationsmuster aufwies (vergleiche Abbildungen 4.10 und 4.11). Unter Berücksichtigung der von Pan *et al.* publizierten Daten bestätigt dies indirekt die zuvor postulierte Hypothese, nach welcher es sich bei den Hsp70-Clustern um in der Abschnürung oder Fusion begriffene SVs handeln könnte. Wie nachfolgend dargestellt, ergaben sich abgesehen vom Lokalisationsmuster des Proteins Alix jedoch noch weitere Hinweise, welche die genannte Annahme untermauern.

## **5.7 Die Proteincluster auf den Oberflächen der T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen stellen sehr wahrscheinlich extrazelluläre Vesikel dar**

Ogleich die Forschung bezüglich der Klassifizierung von EVs, der Charakterisierung der Membranlipide sowie der im Lumen enthaltenen und auf den Oberflächen exponierten Proteine noch am Anfang steht, konnten bereits einige auffällige Besonderheiten aufgedeckt werden. Beispielsweise ist Phosphatidylserin (PS) eine Hauptkomponente der äußeren Membranen der meisten diesbezüglich bislang charakterisierten EVs (Minciacchi *et al.*, 2015a). Hieraus ergibt sich zwangsläufig die Schlussfolgerung, dass PS während der Biogenese von SVs auf den Oberflächen der entsprechenden Zellen exponiert werden muss, wenn die äußeren Membranschichten der abzuschnürenden Vesikel PS enthalten. Dies widerspricht auf den ersten Blick einer ganzen Reihe von Theorien, welche die Exposition von PS in einem gänzlich anderen Zusammenhang beschreiben.

Bekanntlich differieren die zytosolischen und extrazellulären Schichten der Plasmamembranen etwa von tierischen Zellen unter anderem dahingehend, dass das Vorhandensein von PS auf die zytosolischen Schichten begrenzt ist. Die Translokation von PS auf die extra-

plasmatische Seite und die daraus resultierende Exposition der Phospholipide wurden ursprünglich als Alleinstellungsmerkmal apoptotischer Zellen angesehen. Auch wurde davon ausgegangen, dass PS-exponierende Zellen zwangsläufig durch Phagozyten eliminiert würden. Inzwischen hat sich jedoch herausgestellt, dass beide Theorien in dieser allgemeingültigen Form nicht zutreffend sind. So zeigten etwa Riedl *et al.* am Beispiel diverser Tumorzelllinien und Primärkulturen, dass PS auf den Oberflächen nicht-apoptotischer Tumorzellen vorhanden sein kann (Riedl *et al.*, 2011). Darüber hinaus demonstrierten Segawa *et al.* am Mausmodell, dass die Exposition von PS allein nicht immer ausreichend ist, um eine Reaktion phagozytierender Zellen auszulösen (Segawa *et al.*, 2011). Ähnliches wurde auch bei humanen Zellen beobachtet, wenngleich nur unter Zellkultur-Bedingungen (Borisenko *et al.*, 2003; Devitt *et al.*, 2003). Demensprechend kann davon ausgegangen werden, dass die Exposition von PS keine zwangsläufige Folge von Apoptose ist und auch für T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen keine Besonderheit darstellen würde.

Bemerkenswert an PS ist weiterhin, dass eine ganze Reihe von Proteinen, die direkt mit Phospholipiden interagieren können, hierbei PS bevorzugen. Zu diesen zählen neben Hsp70 auch GAPDH, die Laktat-Dehydrogenase (LDH) und Tubulin (Caron und Berlin, 1987; Terlecki *et al.*, 2006; Montalbano *et al.*, 2012; Mahalka *et al.*, 2014). Von GAPDH und Tubulin ist weiterhin bekannt, dass diese Proteine auf den extraplasmatischen Seiten der Plasmamembranen von Tumorzellen vorhanden sein können (Rubin *et al.*, 1982; Correa *et al.*, 2010). Im Falle von LDH zeigten Campanella *et al.* am Beispiel von Erythrozyten, dass dieses an der Plasmamembran der Zellen akkumuliert (Campanella *et al.*, 2005). Da letztere Autoren jedoch mit permeabilisierten Zellen arbeiteten, gingen sie von einer ausschließlich zytoplasmatischen Lokalisation des Enzyms aus.

Interessanterweise zeigten die eigenen fluoreszenzmikroskopischen Analysen, dass auch GAPDH, LDH und  $\alpha$ -Tubulin auf den extraplasmatischen Seiten der Plasmamembranen unpermeabilisierter T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen in Clustern akkumulierten (vergleiche Abbildungen 4.8 und 4.9). Darüber hinaus kolokalisierten GAPDH und  $\alpha$ -Tubulin perfekt mit Hsp70 (Abbildung 4.10). Eine diesbezügliche Prüfung von LDH wurde zwar nicht durchgeführt. Aufgrund der identischen Lokalisationsmuster von LDH und Hsp70 kann eine Kolokalisation jedoch vorausgesetzt werden. Des Weiteren erwiesen sich auch die GAPDH-, LDH- und  $\alpha$ -Tubulin-Cluster während der fluoreszenzmikroskopischen Analysen als nicht Detergenzien-resistent (Abbildung 4.9). Hierbei wurde zur Permeabilisierung ein Puffer genutzt, welcher unter anderem 0,1 % Triton X-100 und 190 mM Natriumchlorid enthielt (vergleiche Tabelle 3.14). Im Rahmen der biochemischen Analysen hingegen

erfolgte die Fraktionierung ohne Verwendung von Detergenzien, wobei nicht nur  $\alpha$ -Tubulin, sondern auch GAPDH und LDH in den Membranfraktionen detektierbar waren (Abbildung 4.1). Gemeinhin können integrale Membranproteine mit Triton X-100 sowie Natriumchlorid in den für die fluoreszenzmikroskopischen Analysen genutzten Konzentrationen nicht rückstandsfrei aus Membranen extrahiert werden (Jagow und Revzin, 2013). Daher kann davon ausgegangen werden, dass zumindest GAPDH und LDH auf den Zelloberflächen praktisch ausschließlich als peripherere Membranproteine vorliegen.

Zusammenfassend betrachtet liegt somit die Vermutung nahe, dass die Akkumulation der genannten Proteine und von Hsp70 eine direkte Konsequenz der Exposition von PS auf den Zelloberflächen darstellen könnte, die im Rahmen der SV-Biogenese wahrscheinlich zwangsläufig erfolgt. Diese Hypothese wird gestützt durch die von Schilling *et al.* demonstrierte Kolo-kalisation von Hsp70 und PS auf den Oberflächen von Zellen der aus CX2-Kolonadenokarzinom-Zellen generiert Subzelllinie CX- (Schilling *et al.*, 2009).

### **5.8 Centrin, die $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und Galektin-3 akkumulieren auf den mutmaßlichen extrazellulären Vesikeln Tumorzelltyp-spezifisch**

Insgesamt betrachtet stützten die zuvor dargestellten Ergebnisse zwar die Hypothese, dass es sich bei den Protein-Clustern um SVs handeln könnte, deren Membranen PS enthalten. Jedoch musste aufgrund nachfolgend beschriebener Beobachtungen zunächst die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, die Detektion der Cluster auf den unpermeabilisierten Zellen könnte auf fixationsbedingte Artefaktbildung zurückzuführen sein.

Beispielsweise erschien Centrin auf T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen ebenfalls in Clustern lokalisiert, die frappierend den Hsp70-Clustern ähnelten, obgleich es sich bei Centrin im Falle humaner Zellen um ein intrazelluläres Protein handeln sollte (Abbildung 4.9). Diesbezüglich muss jedoch berücksichtigt werden, dass der genutzte Primärantikörper gemäß den Angaben des Herstellers nicht nur Centrin-1, sondern auch Centrin-2 bindet. Letzteres ist bei humanen Zellen zwar größtenteils zytosolisch lokalisiert, jedoch nicht mit Zentrosomen assoziiert (Paoletti *et al.*, 1996). Auch sind Funktionen und Eigenschaften von Centrin-2 bislang nur ansatzweise charakterisiert. Daher ist es zumindest denkbar, dass es sich bei den Clustern um extrazelluläres Centrin-1 oder Centrin-2 handeln könnte.

Auch die Untereinheiten ATP1A1, ATP1A2 und ATP1A3 von  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen akkumulierten in Clustern, wenngleich nur auf den MCF7- und U2OS-Zellen (Abbildung 4.9). Auf den T47D-Zellen erschienen diese hingegen flächiger verteilt. Diese Lokalisationsmuster sind zwar auffällig, jedoch ist die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in aktiver Form in den Membranen von

SVs enthalten und die Enzymaktivität in hohem Maße von PS abhängig (Taylor *et al.*, 1983; Haviv *et al.*, 2013; Michalak *et al.*, 2013). Daher scheint es plausibel, dass auch dieses Protein auf der Zelloberfläche in Bereichen akkumuliert, in welchen PS-haltige SVs abgeschnürt werden. Im Gegensatz zur  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase war Galektin-3 auf den T47D- und MCF7-Zellen in Clustern lokalisiert, erschien auf den U2OS-Zellen flächiger verteilt, koloalisierte jedoch grundsätzlich mit Hsp70 (Abbildung 4.12). Darüber hinaus ließ sich das  $\beta$ -Galaktoside-bindende Protein bei keiner der drei Zelllinien mit Laktose von der Zelloberfläche entfernen. Letzteres erscheint auf den ersten Blick nicht verwunderlich, da Lukyanov *et al.* eine direkte Interaktion von Galektin-3 mit Phospholipiden und unter anderem mit PS demonstrierten (Lukyanov *et al.*, 2005). Jedoch konnten derartige Interaktionen im Rahmen einer weiteren Studie nicht reproduziert werden (von Mach, 2013). Darüber hinaus ist der Einfluss von Laktose auf die Bindung von Galektin-3 an Glykoliganden auf der Zelloberfläche ein gut dokumentiertes Phänomen (von Mach *et al.*, 2014). Allerdings erfolgten die Studien von Mach *et al.* überwiegend am Beispiel epithelbildender, caniner MDCK-Nierenzellen sowie mittels fluoreszierender Galektin-3-Fusionsproteine und ohne gesonderte Betrachtung von PS. Dementsprechend kann zumindest nicht ausgeschlossen werden, dass Galektin-3 auf den T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen tatsächlich mit PS interagiert oder an glykosylierte Lipide beziehungsweise Proteine gebunden ist, für deren Kohlenhydratgruppen es eine im Vergleich zur Laktose höhere Affinität besitzt.

Somit erscheint das Vorhandensein beziehungsweise die Verteilung von Centrin, der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und Galektin-3 auf den unpermeabilisierten Zellen fragwürdig, kann aber plausibel erklärt werden. Im Falle der Lokalisationsmuster von Cavelin-1 ist dies nicht ohne Weiteres möglich. Caveolin-1 ist ein wichtiges Strukturelement der Caveolae und es wird angenommen, dass das Protein mittels einer zentralen, Haarnadel-förmigen und hydrophoben Region zwischen den intra- und extrazellulären Schichten der Plasmamembran verankert ist (Williams und Lisanti, 2004). Hierbei wird die extrazelluläre Membranschicht jedoch nicht durchspannt. Der für die Markierung des Proteins genutzte monoklonale Primärantikörper D46G3 wurde nach Angabe des Herstellers unter Verwendung eines synthetischen Peptides erzeugt, welches einen Teil der zytoplasmatisch lokalisierten N-terminalen Region des Proteins umfasste. Dementsprechend war nicht davon auszugehen, Caveolin-1 auf den unpermeabilisierten Zellen nachweisen zu können.

Tatsächlich war Cavelin-1 jedoch detektierbar, erschien auf den unpermeabilisierten T47D- und MCF7-Zellen flächig verteilt, koloalisierte auf den MCF7-Zellen mit Hsp70 und zeigte bei unpermeabilisierten und permeabilisierten U2OS-Zellen ein punktförmiges

Lokalisationsmuster (Abbildungen 4.6 und 4.9). Letzteres ist umso bemerkenswerter, als Gargalovic *et al.* eine Kolokalisation von Caveolin-1 und PS auf den Oberflächen von Makrophagen beschrieben (Gargalovic und Dory, 2003). Da die Autoren jedoch mit indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie und permeabilisierten Zellen arbeiteten, erscheint deren Behauptung, Caveolin-1 auf den extraplastischen Seiten der Plasmamembranen detektiert zu haben, zumindest fragwürdig. Allerdings wird Caveolin-1 beispielsweise von Prostata-Tumorzellen aktiv sekretiert, wobei jedoch noch unklar ist, ob das Protein in freier Form oder EV-abhängig externalisiert wird (Tahir *et al.*, 2001). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass Caveolin-1 bei einigen Tumorzelltypen auch auf den extrazellulären Seiten der Plasmamembranen vorhanden sein könnte.

Interessanterweise zeigten Lee *et al.*, dass Caveolin-1 von T47D- und MCF7-Zellen nicht exprimiert wird, was Engelman *et al.* auf eine funktionelle Methylierung von Cytosin-Guanin-Paaren innerhalb der Promotor-Region des Caveolin-1-Gens zurückführten (Lee *et al.*, 1998; Engelman *et al.*, 1999). Demgegenüber belegten Du *et al.* das Vorhandensein von Caveolin-1 im Falle der MCF7-Zellen (Du *et al.*, 2014). Davon abgesehen demonstrierten Aoki *et al.*, dass bei Caveolin-1 das Einbringen einer Punktmutation in die Transmembranregion ausreichend ist, um die Bildung einer die Plasmamembran vollständig durchspannenden Form des Proteins auszulösen (Aoki *et al.*, 2010). Hierbei wird die N-terminale Domäne von Caveolin-1 auf die extraplastische Seite der Zellmembran transloziert. Dementsprechend ist es denkbar, dass die analysierten Tumorzellen Caveolin-1 infolge fortschreitender Entdifferenzierung exprimieren oder in mutierter Form synthetisieren, was die korrekte kotranslationale Membraninsertion behindern könnte. Unter Berücksichtigung der bei unpermeabilisierten und permeabilisierten U2OS-Zellen nahezu identischen punktförmigen Lokalisationsmuster (Abbildung 4.9 I) kann darüber hinaus nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Fixierung Caveolin-1-Multimeren untereinander oder mit anderen Membranproteinen quervernetzt wurden. Dies könnte ein ähnlicher Effekt ausgelöst haben, wie ihn Aoki *et al.* demonstrierten.

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Proteinen waren Aktin und Hsp60 auf den unpermeabilisierten T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen kaum detektierbar. Im Falle von Aktin ließen sich bei Nutzung klassischer Fluoreszenzmikroskopie auf den MCF7-Zellen zwar sehr schwache Fluoreszenzsignale erahnen (Abbildung 4.9 A). Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie war Aktin hingegen nicht nachweisbar (Abbildung 4.10 A). Der hierbei genutzte monoklonale Primärantikörper Ab-5 bindet gemäß den Angaben des Herstellers jedoch alle bekannten Isoformen der Aktin-Strukturproteine. Daher kann ange-

nommen werden, dass Proteine der Aktin-Familie auf den extraplasmatischen Seiten der Plasmamembranen der analysierten Tumorzellen - zumindest im Vergleich zu den meisten der zuvor genannten Proteine - nur in relativ geringen Mengen vorhanden sind. Hsp60 hingegen war auf den MCF7-Zellen nicht, auf den T47D-Zellen kaum, auf den U2OS-Zellen aber zumindest schwach detektierbar (Abbildung 4.9 B). Diese Beobachtungen stehen zwar im Widerspruch zu den Ergebnissen einiger Autoren, welche das Vorhandensein von Hsp60 auf den Oberflächen von gesunden Zellen wie auch von Tumorzellen demonstrieren (Soltys und Gupta, 1996; Shin *et al.*, 2003). Allerdings wurden die T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen diesbezüglich bislang noch nicht charakterisiert. Dementsprechend kann vermutet werden, dass Hsp60 auf den untersuchten Tumorzellen nur in vergleichsweise geringen Mengen vorhanden ist. Auch könnte Hsp60 größtenteils in einer Form vorliegen, für welche der genutzte Primärantikörper ab13532 nicht ausreichend spezifisch ist. Weiterhin ist es denkbar, dass die Exposition von Hsp60 auf den extrazellulären Seiten der Plasmamembran bei Tumorzellen kein generelles Phänomen darstellen könnte.

Zusammenfassend betrachtet und unter Berücksichtigung der genutzten Methoden scheint es somit unwahrscheinlich, dass die Protein-Cluster auf den unpermeabilisierten Zellen artifizieller Natur sind. Zwar wäre es grundsätzlich möglich, dass durch die Quervernetzung von Membranproteinen Öffnungen in der Plasmamembran geschaffen werden, also auch Proteine auf der zytoplasmatischen Seite der Membran detektiert werden könnten. In diesem Falle hätten jedoch alle genutzten Antikörper bei allen Zelllinien identische Lokalisationsmuster zeigen müssen. Dies war bei den meisten Zielproteinen jedoch nicht der Fall (Abbildungen 4.9, 4.10 und 4.12). Weiterhin wäre es denkbar, dass zum Teil nicht die Proteine selbst detektiert wurden, sondern nur Bruchstücke derselben. Letztere könnten etwa durch Haupthistokompatibilitätskomplexe der Klasse I (nach der englischen Bezeichnung "*Major Histocompatibility Complex*" nachfolgend als "MHC" bezeichnet) exponiert worden sein. Dies würde aber bedeuten, dass die Tumorzellen MHC-Klasse-I-Komplexe auf der Zelloberfläche in eng begrenzten Bereichen konzentrieren, was die Bedeutung der beschriebenen Strukturen lediglich untermauern würde. Letzteres gilt auch für den Fall, dass einige der betrachteten Zielproteine tatsächlich nicht direkt mit der Plasmamembran interagieren, sondern an proteinartige Rezeptoren gebunden sind.

Insgesamt betrachtet bleibt somit die Biogenese von SVs die wahrscheinlichste Erklärung für die Akkumulation von Hsp70, Alix, Centrin, GAPDH, LDH,  $\alpha$ -Tubulin und der Untereinheiten der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen in begrenzten Bereichen der Zelloberfläche. Darüber hinaus lassen die bei den untersuchten Tumorzelllinien im Falle von Aktin, Galektin-3, Hsp60 und

der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase beobachteten unterschiedlichen Lokalisationsmuster und Fluoreszenzsignalintensitäten (Abbildungen 4.9 bis 4.12) vermuten, dass die Komposition der auf den vermeintlichen SVs exponierten Proteine für einzelne Zelltypen spezifisch sein könnte.

### 5.9 Das Membran-assoziierte Hsp70 ist sehr wahrscheinlich nicht aktiv

Hsp70 in Form integraler Plasmamembranproteine wurde bislang nur bei Tumorzellen dauerhaft und in relevanter Menge nachgewiesen, nicht jedoch bei korrespondierenden gesunden Zellen (Multhoff *et al.*, 1995). Da sich somit diese Form der Chaperone als genereller Tumormarker eignen würde, wird derzeit nach Möglichkeiten geforscht, das integrale Hsp70 etwa mittels geeigneter Peptide gezielt zu markieren und *in vitro* beziehungsweise *in vivo* nachzuweisen. Die grundsätzliche Nutzbarkeit dieses Verfahrens demonstrierten Gehrman *et al.* unter Zellkulturbedingungen und Stangel *et al.* am Mausmodell (Gehrman *et al.*, 2014; Stangl *et al.*, 2014). Die Autoren verwendeten hierbei ein Fluorochromgekoppeltes Peptid, dessen primäre Sequenz der eines zwischen Substratbinde- (SBD) und Nukleotidbindedomäne (NBD) gelegenen Bereiches von Hsp70 entsprach (gemäß der von den Autoren verwendeten englischen Bezeichnung "*Tumor Cell-penetrating Peptide-based Probe*" nachfolgend mit "TPP-Peptid" abgekürzt). Hierbei konnte gezeigt werden, dass das TPP-Peptid an den zwischen SBD und NBD befindlichen und die Dimerisierung von Hsp70 ermöglichenden Bereich der Chaperone bindet, welcher bei integralem Hsp70 extrazellulär lokalisiert ist. Darüber hinaus wurde demonstriert, dass die Bindung des Peptides eine Internalisierung von Hsp70 auslöst (vergleiche Abbildung 2.5). Eine Aufnahme des TPP-Peptides wurde auch bei gesunden Zellen beobachtet, jedoch in deutlich geringerer Mengen als bei korrespondierenden Tumorzellen (Stangl *et al.*, 2014).

Demgegenüber wurde im Rahmen der eigenen Analysen versucht, Hsp70 mittels des von Zhu *et al.* charakterisierten Substratpeptides zu markieren (Zhu *et al.*, 1996). Dessen N-Terminus wurde zwecks Unterbindung sterischer Substituenteneffekte um eine kurze Aminosäuresequenz erweitert und an 5(6)-Carboxyfluorescein (CFL) gekoppelt (nachfolgend als "NRL-Peptid" bezeichnet). Als Negativkontrollen wurde unter anderem ein Peptid genutzt, bei welchem drei für die Interaktion mit Hsp70 essentielle hydrophobe Aminosäuren durch hydrophile Reste substituiert worden waren (nachfolgend als Kontroll-Peptid bezeichnet beziehungsweise mit "KTR-Peptid" abgekürzt). Mittels des NRL-Peptides gelang es jedoch nicht, das von Gehrman *et al.* etwa am Beispiel muriner 4T1- und humaner MCF7-Mammakarzinom-Zellen demonstrierte Lokalisationsmuster des TPP-Peptides bei MCF7- und T47D-Zellen zu reproduzieren (Gehrman *et al.*, 2014). Vielmehr ergaben sich

bei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen bezüglich Fluoreszenzintensität sowie Lokalisationsmuster nur extrem geringfügige Unterschiede zwischen den mit NRL- und den mit KTR-Peptiden behandelten Zellen (Abbildungen 4.14 bis 4.16.). Beide Peptide wurden unter physiologischen Bedingungen von den Zellen aufgenommen, waren jedoch auch bei Unterbindung der Endozytose durch Inkubation bei niedrigen Temperaturen auf den Oberflächen der Zellen detektierbar (Abbildung 4.15). Hierbei zeigten beide Peptide ein punktförmiges, flächiges Lokalisationsmuster, welches sich deutlich von den beschriebenen Hsp70-Clustern unterschied (vergleiche Abbildungen 4.7 und 4.15). Darüber hinaus musste festgestellt werden, dass mit Peptiden und mit ungekoppelten Fluorochromen behandelte Zellen ähnlich hohe Fluoreszenzintensitäten aufwiesen (Abbildung 4.16). Da das Fluorochrom CFL zwar hydrophil, aber negativ geladen ist (Bajoria und Contractor, 1997), lässt dies vermuten, dass geringfügige Anteile der NRL- und KTR-Peptide Fluorochromvermittelt mit Komponenten der Plasmamembran interagierten, es sich bei den detektierten Signalen also nur um "Hintergrundfluoreszenz" handelte.

Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) zwar für die Chaperonfunktion von Hsp70 erforderlich ist, also für die Bindung, Arretierung und anschließende Freisetzung von Substraten (Mayer und Bukau, 2005). Allerdings kann die SBD auch in Abwesenheit von ATP oder ADP in offener Konformation vorliegen. Darüber hinaus ist selbst ein auf diese Domäne reduziertes Hsp70-Fragment in der Lage, Substrate zu bindet (Zhu *et al.*, 1996; Slepnev und Witt, 1998). Demensprechend kann angenommen werden, dass Hsp70 grundsätzlich in der Lage ist, etwa mit NRL-Peptiden auch ohne ATP beziehungsweise ADP zu interagieren. Nicht abzuschätzen ist allerdings, ob eine Verdrängung bereits gebundener Substrate durch Peptide möglich wäre, für deren Aminosäuresequenzen Hsp70 eine höhere Spezifität aufweisen würde.

Zusammenfassend betrachtet zeigen die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sehr deutlich, dass die NRL-Peptide durch das auf den Zelloberflächen exponierte periphere beziehungsweise integrale Hsp70 nicht gebunden wurden. Unter Berücksichtigung der beschriebenen Besonderheiten des Chaperons lässt sich somit vermuten, dass das auf Tumorzellen vorhandene Hsp70 nicht aktiv ist. Mögliche Gründe hierfür könnten sein, dass die NBD in die Plasmamembranen integriert ist, Hsp70 in dimerisierter Form vorliegt oder eine Auflösung der Dimere beziehungsweise Verdrängung bereits gebundener Substrate aufgrund des Mangels an extrazellulärem ATP nicht möglich ist. Im Falle des peripheren Hsp70 muss weiterhin die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass eine Bindung von



Substratpeptiden die Interaktion mit PS inhibieren und demzufolge eine Dissoziation von der Plasmamembran auslösen könnte. Versuche zur Prüfung dieser Hypothese mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden zwar unternommen, scheiterten aber in Ermangelung einer Möglichkeit, die gegebenenfalls von Hsp70 gebundenen Peptide beziehungsweise die an diese gekoppelten Fluorochrome detektieren zu können. Auf eine abschließende Klärung der dargestellten Sachverhalte wurde verzichtet, da die für die Tumorthherapie oder Tumordiagnostik erforderliche, dauerhafte Markierung des auf den Zelloberflächen exponierten Hsp70 - zumindest unter Verwendung eines die von Zhu *et al.* beschriebenen Sequenz beinhaltenden CFL-gekoppelten Substratpeptides - nicht möglich ist beziehungsweise nicht zielführend zu sein scheint (Zhu *et al.*, 1996).

## **5.10 Zusammenfassung, immunologische Relevanz der Ergebnisse, Implikationen für Tumordiagnostik und Tumorthherapie, Ausblick**

Einerseits illustrieren die zuvor diskutierten Ergebnisse der biochemischen und fluoreszenzmikroskopischen Analysen von T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen anschaulich, dass die basalen und stressinduzierten Expressions- beziehungsweise Lokalisationsmuster bestimmter Proteine bei unterschiedlichen Tumorzelltypen differieren können. Andererseits lässt insbesondere der Vergleich der Hsp70 betreffenden Resultate der drei Tumorzelllinien vermuten, dass sich einige der beschriebenen Eigenheiten der Zellen durchaus als Ansatzpunkte für Tumordiagnostik oder Tumorthherapie eignen könnten.

### **5.10.1 Implikationen der Ergebnisse der biochemischen Analysen der basalen Hsp70-Expressionsniveaus sowie der Hsp70-Stressantworten für die Tumorthherapie**

Bislang verfügbare klinische Studien zeigen bezüglich basaler Hsp70-Expression und Behandlungsprognose keinen einheitlichen Zusammenhang (Ciocca und Calderwood, 2005; Calderwood *et al.*, 2006). So korreliert die Expression von Chaperonen der HSP70-Familie mit einer negativen Prognose etwa bei Brust-, Endometrium- oder Uteruskrebs, Zervixkarzinomen und Übergangsepithelkarzinomen der Harnblase. Im Falle etwa von Melanomen, Oesophagus-, Pankreas- und Nierenkrebs korreliert die Expression hingegen mit einer positiven Prognose. Demgegenüber konnte etwa bei Ovarialkarzinomen, Mundhöhlen- und Magentumoren, Prostatakrebs oder Leukämie keine Korrelation gezeigt werden.

Derzeit mangelt es an belastbaren klinischen Studien, die quantitativen Vergleiche der basalen Hsp70-Expressionsniveaus von Tumorzellen mit korrespondierenden gesunden Zellen sowie von verschiedenen Tumorzelltypen relativ zueinander ermöglichen. Trotzdem lassen die Ergebnisse und Schlussfolgerungen diverser Autoren vermuten, die Höhe der

basalen Hsp70-Expression könne einer der für die Stress- beziehungsweise Therapie-resistenz von Tumorzellen ausschlaggebenden Faktoren sein (Parsell und Lindquist, 1994; Nollen *et al.*, 1999). Die Ergebnisse der eigenen biochemischen Analysen schienen diese Theorie zunächst zu bestätigen. So zeigten die T47D-Zellen im Vergleich zu den MCF7- und U2OS-Zellen ein höheres basales Hsp70-Expressionsniveau und einen schwächeren Hsp70-Expressionsanstieg nach Stressexposition (vergleiche Abbildungen 4.2 und 4.5). Andererseits reagierten die T47D-Zellen mit einer Verringerung der Expression von Hsc70 auf den Hitzeschock, obwohl diese Zellen bereits unter physiologischen Bedingungen vergleichsweise wenig Hsc70 exprimierten (vergleiche Abbildungen 4.2 und 4.4). Die MCF7- und U2OS-Zellen hingegen verstärkten die Hsc70-Expression nach Stressexposition. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass zytotoxische Effekte die maximal exprimierbaren Mengen von Chaperonen der HSP70-Familie begrenzen könnten. Anders ausgedrückt: Die basale Stressresistenz einer Zelle könnte nicht nur von der Menge der unter physiologischen Bedingungen exprimierten Chaperone abhängen, sondern darüber hinaus durch das maximal erreichbare Expressionsniveau beeinflusst werden.

Um letztere Hypothese zu prüfen ist es erforderlich, zunächst die basale Stresstoleranz verschiedener Tumorzelllinien zu ermitteln. Aufbauend auf den dargestellten Ergebnissen könnten etwa die T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen so lange bei verschiedenen Temperaturen um 44 °C inkubiert werden, bis erste Anzeichen für Apoptose erkennbar werden. Sollte die allgemeine Stressresistenz von Tumorzellen hauptsächlich vom basalen Hsp70-Expressionsniveau abhängen, müssten hierbei Stresstoleranz und basale Expression korrelieren. Die T47D-Zellen müssten also über längere Zeiträume höheren Temperaturen widerstehen können als die MCF7- und die U2OS-Zellen.

Für die Tumorthherapie bedeutsamer wäre jedoch die Analyse der über die basale Stressresistenz hinaus induzierbaren Stresstoleranz der Zellen. Wie dargelegt sind viele Tumorzellen auf die Expression von Chaperonen wie Hsp70 zwingend angewiesen, weshalb diese Proteine von vielen Autoren als "Achillesfersen" tumorigener Zellen betrachtet werden (Ciocca und Calderwood, 2005). Dementsprechend konzentriert sich ein großer Teil der Forschung auf Möglichkeiten, die Expression von Stressproteinen direkt oder indirekt zu reduzieren oder die zytoprotektiven Funktionen der Chaperone zu überlasten. Letzteres wird etwa umgesetzt, indem Tumore zeitgleich und langfristig mehreren Stressfaktoren ausgesetzt werden. Dieses Prinzip liegt verschiedenen Therapieverfahren zugrunde, die beispielsweise in Form der Kombination von Hyperthermie- mit Strahlen- oder Chemotherapie bereits praktische Anwendung finden (Issels *et al.*, 2010; Kaur *et al.*, 2011). Insge-

samt betrachtet steht allerdings zu befürchten, dass bei derartigen Therapieansätzen zur Behandlung von Tumorzellen mit hoher basaler Expression von Stressproteinen sehr starke Stressintensitäten oder langfristige Stressexpositionen erforderlich sein könnten, wobei mit umfangreichen Schädigungen gesunder Zellen zu rechnen wäre.

Sollte die Stressresistenz im Falle von Hsp70 jedoch nicht allein von der Höhe des basalen Expressionsniveaus abhängen, sondern durch das maximal erreichbare Expressionsniveau begrenzt werden, ließen sich die Chaperone möglicherweise auch als "Trojanische Pferde" nutzen. So könnten Tumorzellen mit hohem basalem Hsp70-Expressionsniveau durch mehrfache, kurzfristige Exposition gegenüber Stressfaktoren vergleichsweise geringer Intensität zunächst dazu gezwungen werden, die Expression von Hsp70 bis zum jeweiligen Maximum zu steigern. Sollte die genannte Hypothese korrekt sein, könnte eine anschließende Exposition gegenüber höheren Stressintensitäten oder andersartigen Stressfaktoren bei solchen Tumorzellen Apoptose oder Nekrose auslösen. Gesunde Zellen hingegen würde eine derartige Vorgehensweise nur relativ geringfügig belasten.

Um die Brauchbarkeit letzteren Therapieansatzes zu prüfen, sollte die maximal induzierbare Stresstoleranz der T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen bestimmt werden. Hierzu müssten die Zellen mehreren Zyklen von Stressexposition und anschließender Erholungsphase ausgesetzt werden. Aufgrund der eigenen Vorarbeiten würden sich hierbei Stressintensitäten von 44 °C und Erholungsphasen von sechs bis acht Stunden anbieten. Wäre die maximal exprimierbare Hsp70-Menge tatsächlich infolge zytotoxischer Wirkungen begrenzt, müssten die T47D-Zellen hierbei eine geringere Anzahl von Zyklen überstehen als die MCF7- und U2OS-Zellen. Darüber hinaus sollte nach mehrfacher Stressexposition eine Reduzierung der Hsc70-Expression auch bei MCF7- und U2OS-Zellen feststellbar sein.

#### **5.10.2 Immunologische Relevanz der Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Analysen und Implikationen der Lokalisationsmuster für die Tumordiagnostik**

Wie bereits dargestellt, wurde bislang eine Vielzahl von Studien veröffentlicht, welche das Vorkommen von Hsp70 in Form integraler Proteine der Plasmamembran bei Tumorzellen beschreiben, die Exposition von PS demonstrieren oder die Sekretion von TMVs beziehungsweise die Abschnürung von SVs zeigen. Dies lässt den Eindruck entstehen, es könne sich hierbei um besondere Merkmale tumorigener Zellen handeln. Sowohl das integrale Hsp70 wie auch PS fungieren jedoch als Erkennungsstrukturen für phagozytierende Zellen beziehungsweise natürliche Killerzellen (Multhoff *et al.*, 1995; Erwig und Henson, 2008; Multhoff und Hightower, 2011). Daher drängt sich in diesem Zusammenhang zwangsläufig die Frage auf, wie Tumorzellen die gegen sie gerichteten Reaktionen des Immunsys-

tems umgehen können, obwohl sie immunaktivierende Moleküle wie Hsp70 und PS dauerhaft auf den extraplasmatischen Seiten ihrer Zellmembranen exponieren. Im Falle von PS wird angenommen, dass dieses nur einer von mehreren relevanten Faktoren ist und eine gewisse Menge desselben exponiert werden muss, um eine Reaktion phagozytierender Zellen auszulösen (Borisenko *et al.*, 2003; Devitt *et al.*, 2003; Segawa *et al.*, 2011). Ob ähnliches auch für Hsp70 gilt, wurde bislang nicht untersucht, lässt sich aufgrund der bei verschiedenen Tumorzelltypen differierenden Mengen von integralem Hsp70 jedoch annehmen. Demgegenüber lassen die Ergebnisse der eigenen Analysen vermuten, dass für die fehlende beziehungsweise schwache Reaktion des Immunsystems auf tumorigene Zellen ein alternativer Erklärungsansatz in Betracht gezogen werden muss.

Sollten die drei untersuchten Zelllinien tatsächliche große SVs bilden, deren äußere Membranschichten PS enthalten und auf deren Oberfläche der größte Teil des integralen beziehungsweise des peripheren Hsp70 vorhanden ist, würden phagozytierende Zellen sehr wahrscheinlich auf diese SVs reagieren. Voraussetzung hierfür ist im Falle von PS jedoch, dass dieses zugänglich ist. Wäre PS durch mit diesem interagierende Proteine überdeckt, würde keine Phagozytose erfolgen (Bennett *et al.*, 1995; Krahling *et al.*, 1999). Dementsprechend ist es denkbar, dass das Immunsystems auf tumorigene Zellen während der Biogenese von SVs zunächst nur schwach reagiert, da PS sowie möglicherweise auch das integrale Hsp70 durch peripher mit PS interagierende Proteine abgeschirmt werden.

Interessanterweise sind auf Tumore zurückzuführende SVs nicht nur in der direkten Umgebung derselben zu finden, sondern können auch in Blut und Urin enthalten sein (Di Vizio *et al.*, 2012; D'Souza-Schorey und Clancy, 2012). Somit ist es denkbar, dass die Immunantwort im Falle tumorigener Zellen infolge der Abschnürung und der folgenden weiträumigen Verteilung von SVs langfristig ins Leere läuft, da die Immunreaktion auf die SVs fokussiert und somit von den Tumorzellen abgelenkt wird. Diese Hypothese wird gestützt durch die von Vega *et al.* demonstrierte Aktivierung von Makrophagen durch EVs, welche Hsp70 zumindest in Form integraler Membranproteine enthalten (Vega *et al.*, 2008). Die Ergebnisse der eigenen fluoreszenzmikroskopischen Analysen stimmen mit den letztgenannten Hypothesen überein. So kolokalisierten immunaktivierende (Hsp70) beziehungsweise zur direkten Interaktion mit PS fähige Proteine auf den Oberflächen aller (Hsp70, GAPDH,  $\alpha$ -Tubulin) oder der meisten (Galektin-3) untersuchten Tumorzellen in eng begrenzten Bereichen von vesikulärer Erscheinung (Abbildungen 4.10 und 4.12).

Um die zuvor genannten Hypothesen zu verifizieren, sollte in einem ersten Schritt geprüft werden, ob die extrazellulären Schichten der Plasmamembranen von T47D-, MCF7- und

U2OS-Zellen PS enthalten und ob dieses mit Hsp70, GAPDH, Galektin-3, LDH und  $\alpha$ -Tubulin kolokalisiert. Letzteres ließe sich fluoreszenzmikroskopisch bewerkstelligen, wobei sich zur Markierung von PS Fluorochrom-gekoppeltes Annexin-V anbietet. Die einzelnen Zielpoteine könnten direkt oder indirekt immunfluoreszenzmarkiert werden. Die Visualisierung der Lokalisationsmuster beziehungsweise die Prüfung auf Kolokalisation wäre etwa mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie umzusetzen. Parallel sollte analysiert werden, ob sich die Intensitäten der Annexin-V-Fluoreszenzsignale variieren lassen, indem die vermeintlich direkt mit PS interagierenden Proteine beispielsweise mittels Hochsalz- oder Niedrig-pH-Puffern entfernt werden.

Sollten letztere Experimente erfolgreich verlaufen, könnte in einem zweiten Schritt unter Zellkultur-Bedingungen analysiert werden, wie phagozytierende Zellen beziehungsweise Makrophagen auf SV-bildende Tumorzellen reagieren. Hierbei wäre unter anderem zu prüfen, wie die Reaktionen ausfallen, wenn die peripher mit PS interagierenden Proteine von den Oberflächen der Tumorzellen entfernt werden, PS mit Annexin-V maskiert oder die Abschnürung der SVs chemisch unterbunden wird. Sollte die Immunantwort tatsächlich durch die Freisetzung von SVs negativ beeinflusst werden, müssten etwa Makrophagen auf die Entfernung der peripheren Proteine beziehungsweise die Unterbindung der SV-Abschnürung mit verstärkter Phagozytoseaktivität reagieren. Die Maskierung von PS hingegen sollte die Phagozytose blockieren.

Ogleich sich die Unterbindung oder Verlangsamung der SV-Biogenese theoretisch als Behandlungsansatz für die Tumorthapie eignen könnte, dürfte die Umsetzung dieses Prinzips einen erheblichen Forschungsaufwand erfordern. Grundsätzliches Problem ist hierbei, dass auch gesunde Zellen SVs generieren, welche unter anderem der interzellulären Kommunikation dienen (D'Souza-Schorey und Clancy, 2012). Darüber hinaus wurde im Rahmen der eigenen Analysen beobachtet, dass Hsp70, GAPDH, LDH und  $\alpha$ -Tubulin auch auf ursprünglich gesunden, aber immortalisierten HK2-Nierenzellen in Clustern akkumulierten, deren Formen und Größen den auf den Tumorzellen beobachteten entsprachen (Abbildung 4.13). Obwohl immortalisierte Zellen eher mit Tumorzellen denn mit gesunden Zellen vergleichbar sind, lässt dies vermuten, dass die Abschnürung von SVs auch bei gesunden, jedoch temporär gestressten Zellen auftreten könnte. Somit muss davon ausgegangen werden, dass eine gezielte Beeinflussung der SV-Abschnürung entdifferenzierter Zellen erforderlich wäre, um die Biogenese von SVs als Ansatzpunkt für die Tumorthapie nutzen zu können. Letzteres ist nach derzeitigem Wissensstand jedoch nicht möglich, ohne dabei auch auf die Bildung von SVs bei gesunden Zellen einzuwirken.

Demgegenüber wäre die Nutzung beispielsweise der im Blutkreislauf zirkulierenden SVs im Rahmen der Tumordiagnostik ein in einem überschaubaren Zeitraum Erfolg versprechender Ansatz. Insbesondere im Falle von Prostata-Tumoren ist dies bereits Gegenstand intensiver Forschung (Brett *et al.*, 2015; Tompkins *et al.*, 2015).

Allgemein wird derzeit angenommen, dass sich die Proteinkompositionen der auf gesunde Zellen beziehungsweise der auf Tumorzellen zurückzuführenden EVs unterscheiden (Miniciacchi *et al.*, 2015b). Daher wird unter anderem versucht, die entsprechenden Proteome so detailliert zu charakterisieren, dass von Tumorzellen abstammende TMVs oder SVs eindeutig identifiziert und von denen gesunder Zellen unterschieden werden können. Allerdings sind die entsprechenden Forschungsansätze momentan noch auf bestimmte Tumortypen beziehungsweise Tumorzelllinien fokussiert, da ursprünglich davon ausgegangen wurde, die Freisetzung von SVs sei ein besonderes Merkmal einiger weniger Tumorzelltypen. Demgegenüber lassen die Ergebnisse der eigenen Analysen vermuten, dass die Biogenese von SVs ein bei Tumorzellen weit verbreitetes Phänomen ist.

Um letztgenannte Hypothese zu überprüfen ist es erforderlich, die sehr wahrscheinlich von den T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen freigesetzten SVs in analysierfähiger Form zu isolieren. Dies wurde im Rahmen des Dissertationsprojektes zwar versucht, scheiterte aber an der vergleichbaren Tendenz zur Aggregation der Zellen und der diesen entstammenden SVs. Dementsprechend müsste zunächst eine Methode etabliert werden, welche die Aggregation der SVs soweit vermindert oder reduziert, dass diese direkt oder indirekt immunfluoreszenzmarkiert und durchflusszytometrisch analysiert sowie etwa durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung von apoptotischen Vesikeln getrennt werden können.

Letzteres könnte etwa durch Kultivierung der Zellen in Durchflussskammern umgesetzt werden. In diesen ließe sich ein ständiger Fluss von Medium erzeugen, welchem Fluorochrom-gekoppelte Antikörper hinzugefügt werden könnten. Durch Sammlung des abfließenden Mediums und direkt anschließende durchflusszytometrische Analyse müsste es so möglich sein, die Aggregation der SVs zu umgehen. Gelänge dies, ließen sich etwa SVs, auf deren Oberflächen integrales oder peripheres Hsp70 vorhanden ist, von solchen trennen, deren Membranen die Chaperone nicht enthalten. Auch wäre es möglich, durch biochemische Isolierung sowie massenspektrometrische Analyse die Gesamt- beziehungsweise die extra- und intraluminalen Proteinkompositionen der SVs zu ermitteln. Sollte sich im Falle letzterer Analysen Hinweise auf eine für einzelne Tumorzelltypen spezifische Zusammensetzung der auf den Oberflächen exponierten oder im Lumen der SVs enthaltenen Proteine ergeben, müsste anhand von Patientenproben geprüft werden, ob dies auch bei

Tumorgewebe der Fall ist. Beispielsweise könnten im Rahmen der operativen Entfernung von Tumoren auch Proben des korrespondierenden gesunden Gewebes sowie Blutproben entnommen werden. Analog zur zuvor beschriebenen Vorgehensweise könnten nach Extraktion der SVs aus den Blutproben geeignete Markerproteine auf deren Oberflächen immunfluoreszenzmarkiert, gegebenenfalls vorhandene unterschiedliche SV-Populationen mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung voneinander getrennt und die resultierenden Isolate biochemisch beziehungsweise massenspektrometrisch analysiert werden.

Durch weiterführende vergleichende Analysen der auf den Oberflächen von SVs sowie von gesunden Zellen und von Tumorzellen vorhandenen Proteine ließen sich dann etwaige Korrelationen zwischen den entsprechenden Proteinkompositionen identifizieren. Wären hierbei tatsächlich eine Tumorzelltyp-spezifische Komposition der Oberflächenproteine *in vivo* nachweisbar, könnte dies die Identifikation bestimmter Tumorarten oder sogar einzelner Tumorzelltypen anhand der im Blutkreislauf zirkulierenden SVs ermöglichen.

Die Nutzung von TMVs und SVs als Tumorbiomarker analog zu bereits etablierten Varianten der Flüssigbiopsie ist bereits Gegenstand der Forschung (Zocco *et al.*, 2014). Letztere Verfahren stützen sich bislang im Wesentlichen auf den Nachweis von DNA beziehungsweise von Proteinen im Blut, die auf Tumorzellen zurückzuführen sind, oder auf die Detektion von frei im Blutkreislauf zirkulierenden Tumorzellen. Eine Berücksichtigung von TMVs und SVs könnte die Möglichkeiten der Flüssigbiopsie beträchtlich erweitern.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alder, G.M., Austen, B.M., Bashford, C.L., Mehler, A., Pasternak, C.A. (1990). **Heat shock proteins induce pores in membranes**. *Bioscience Reports* 10, 509-518.
- Aoki, S., Thomas, A., Decaffmeyer, M., Brasseur, R., Epand, R.M. (2010). **The role of proline in the membrane re-entrant helix of caveolin-1**. *Journal of Biological Chemistry* 285, 33371-33380.
- Aprile, F.A., Dhulesia, A., Stengel, F., Roodveldt, C., Benesch, Justin L P, Tortora, P., Robinson, C.V., Salvatella, X., Dobson, C.M., Cremades, N. (2013). **Hsp70 oligomerization is mediated by an interaction between the interdomain linker and the substrate-binding domain**. *PloS one* 28, e67961.
- Armijo, G., Okerblom, J., Cauvi, D.M., Lopez, V., Schlamadinger, D.E., Kim, J., Arispe, N., de Maio, A. (2014). **Interaction of heat shock protein 70 with membranes depends on the lipid environment**. *Cell Stress & Chaperones* 19, 877-886.
- Arnold-Schild, D., Hanau, D., Spehner, D., Schmid, C., Rammensee, H.G., de la Salle, H, Schild, H. (1999). **Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells**. *Journal of Immunology* 162, 3757-3760.
- Bajoria, R., Contractor, S.F. (1997). **Effect of surface charge of small unilamellar liposomes on uptake and transfer of carboxyfluorescein across the perfused human term placenta**. *Pediatric Research* 42, 520-527.
- Barnes, J.A., Dix, D.J., Collins, B.W., Luft, C., Allen, J.W. (2001). **Expression of inducible Hsp70 enhances the proliferation of MCF-7 breast cancer cells and protects against the cytotoxic effects of hyperthermia**. *Cell Stress & Chaperones* 6, 316-325.
- Barreto, A., Gonzalez, J.M., Kabingu, E., Asea, A., Fiorentino, S. (2003). **Stress-induced release of HSC70 from human tumors**. *Cellular Immunology* 222, 97-104.
- Batulan, Z., Shinder, G.A., Minotti, S., He, B.P., Doroudchi, M.M., Nalbantoglu, J., Strong, M.J., Durham, H.D. (2003). **High threshold for induction of the stress response in motor neurons is associated with failure to activate HSF1**. *Journal of Neuroscience* 23, 5789-5798.
- Beach, A., Zhang, H.G., Ratajczak, M.Z., Kakar, S.S. (2014). **Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer**. *Journal of Ovarian Research* 7, 14.
- Becker, J., Craig, E.A. (1994). **Heat-shock proteins as molecular chaperones**. *European Journal of Biochemistry* 219, 11-23.
- Beckmann, R.P., Mizzen, L., Welch, W.J. (1990). **Interaction of Hsp70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly**. *Science* 248, 850-854.
- Bennett, M.R., Gibson, D.F., Schwartz, S.M., Tait, J.F. (1995). **Binding and phagocytosis of apoptotic vascular smooth muscle cells is mediated in part by exposure of phosphatidylserine**. *Circulation Research* 77, 1136-1142.
- Bertelsen, E.B., Chang, L., Gestwicki, J.E., Zuiderweg, Erik R.P. (2009). **Solution conformation of wild-type *Escherichia coli* Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 8471-8476.



- Bissig, C., Lenoir, M., Velluz, M.C., Kufareva, I., Abagyan, R., Overduin, M., Gruenberg, J. (2013). **Viral infection controlled by a calcium-dependent lipid-binding module in ALIX.** *Developmental Cell* 25, 364-373.
- Borisenko, G.G., Matura, T., Liu, S.X., Tyurin, V.A., Jianfei, J., Serinkan, F.B., Kagan, V.E. (2003). **Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic Jurkat cells - existence of a threshold.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 413, 41-52.
- Bracher, A., Verghese, J. (2015). **The nucleotide exchange factors of Hsp70 molecular chaperones.** *Frontiers in Molecular Biosciences* 2, 10.
- Bradford, M.M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brett, S.I., Kim, Y., Biggs, C.N., Chin, J.L., Leong, H.S. (2015). **Extracellular vesicles such as prostate cancer cell fragments as a fluid biopsy for prostate cancer.** *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 18, 213-220.
- Brinkley, B.R., Beall, P.T., Wible, L.J., Mace, M.L., Turner, D.S., Cailleau, R.M. (1980). **Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cells *in vitro*.** *Cancer Research* 40, 3118-3129.
- Brocchieri, L., Conway de Macario, E., Macario, A.J. (2008). **Hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions.** *BMC Evolutionary Biology* 8, 19.
- Broquet, A.H., Thomas, G., Masliah, J., Trugnan, G., Bachelet, M. (2003). **Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release.** *Journal of Biological Chemistry* 278, 21601-21606.
- Brown, I.R., Rush, S.J. (1999). **Cellular localization of the heat shock transcription factors HSF1 and HSF2 in the rat brain during postnatal development and following hyperthermia.** *Brain Research* 821, 333-340.
- Bruyn, J., Soetaert, K., Buysens, P., Calonne, I., de Coene, J.L., Gallet, X., Brasseur, R., Wattiez, R., Falmagne, P., Montrozier, H. (2000). **Evidence for specific and non-covalent binding of lipids to natural and recombinant *Mycobacterium bovis* BCG hsp60 proteins, and to the *Escherichia coli* homologue GroEL.** *Microbiology* 146, 1513-1524.
- Cai, M.B., Wang, X.P., Zhang, J.X., Han, H.Q., Liu, C.C., Bei, J.X., Peng, R.J., Liang, Y., Feng, Q.S., Wang, H.Y. (2012a). **Expression of heat shock protein 70 in nasopharyngeal carcinomas: different expression patterns correlate with distinct clinical prognosis.** *Journal of Translational Medicine* 10, 96.
- Cai, M.B., Wang, X.P., Zhang, J.X., Han, H.Q., Liu, C.C., Bei, J.X., Peng, R.J., Liang, Y., Feng, Q.S., Wang, H.Y. (2012b). **Expression of heat shock protein 70 in nasopharyngeal carcinomas: different expression patterns correlate with distinct clinical prognosis.** *Journal of Translational Medicine* 10, 96.
- Calderwood, S.K., Khaleque, M., Sawyer, D.B., Ciocca, D.R. (2006). **Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis.** *Trends in Biochemical Sciences* 31, 164-172.

- Campanella, M.E., Chu, H., Low, P.S. (2005). **Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2402-2407.
- Cappello, F., Conway de Macario, E., Marasà, L., Zummo, G., Macario, A.L. (2008). **Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy**. *Cancer Biology & Therapy* 7, 801-809.
- Caron, J.M., Berlin, R.D. (1987). **Dynamic interactions between microtubules and artificial membranes**. *Biochemistry* 26, 3681-3688.
- Chang, Y.W., Sun, Y.J., Wang, C., Hsiao, C.D. (2008). **Crystal structures of the 70-kDa heat shock proteins in domain disjoining conformation**. *Journal of Biological Chemistry* 283, 15502-15511.
- Chappell, T.G., Konforti, B.B., Schmid, S.L., Rothman, J.E. (1987). **The ATPase core of a clathrin uncoating protein**. *Journal of Biological Chemistry* 262, 746-751.
- Chappell, T.G., Welch, W.J., Schlossman, D.M., Palter, K.B., Schlesinger, M.J., Rothman, J.E. (1986). **Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins**. *Cell* 45, 3-13.
- Chen, T., Guo, J., Yang, M., Zhu, X., Cao, X. (2011). **Chemokine-containing exosomes are released from heat-stressed tumor cells via lipid raft-dependent pathway and act as efficient tumor vaccine**. *Journal of Immunology* 186, 2219-2228.
- Chiappori, F., Merelli, I., Milanesi, L., Colombo, G., Morra, G. (2016). **An atomistic view of Hsp70 allosteric crosstalk: from the nucleotide to the substrate binding domain and back**. *Scientific Reports* 6, 23474.
- Chu, A., Matusiewicz, N., Stochaj, U. (2001). **Heat-induced nuclear accumulation of hsc70s is regulated by phosphorylation and inhibited in confluent cells**. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, 1478-1480.
- Ciocca, D.R., Calderwood, S.K. (2005). **Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications**. *Cell Stress & Chaperones* 10, 86-103.
- Clayton, A., Turkes, A., Navabi, H., Mason, M.D., Tabi, Z. (2005). **Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes**. *Journal of Cell Science* 118, 3631-3638.
- Correa, C.R., Bertollo, C.M., Zouain, C.S., Goes, A.M. (2010). **Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a surface associated antigen on human breast cancer cell lines MACL-1 and MGSO-3**. *Oncology Reports* 24, 677-685.
- Daugaard, M., Rohde, M., Jäättelä, M. (2007). **The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions**. *FEBS Letters* 581, 3702-3710.
- de Maio, A. (2011). **Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa**. *Cell Stress & Chaperones* 16, 235-249.
- DeNagel, D.C., Pierce, S.K. (1992). **A case for chaperones in antigen processing**. *Immunology Today* 13, 86-89.

- Devitt, A., Pierce, S., Oldreive, C., Shingler, W.H., Gregory, C.D. (2003). **CD14-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages: the role of phosphatidylserine.** *Cell Death and Differentiation* 10, 371-382.
- Di Vizio, D., Kim, J., Hager, M.H., Morello, M., Yang, W., Lafargue, C.J., True, L.D., Rubin, M.A., Adam, R.M., Beroukhim, R. (2009). **Oncosome formation in prostate cancer: association with a region of frequent chromosomal deletion in metastatic disease.** *Cancer Research* 69, 5601-5609.
- Di Vizio, D., Morello, M., Dudley, A.C., Schow, P.W., Adam, R.M., Morley, S., Mulholland, D., Rotinen, M., Hager, M.H., Insabato, L. (2012). **Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease.** *American Journal of Pathology* 181, 1573-1584.
- Dressel, R., Grzeszik, C., Kreiss, M., Lindemann, D., Herrmann, T., Walter, L., Günther, E. (2003). **Differential effect of acute and permanent heat shock protein 70 overexpression in tumor cells on lysability by cytotoxic T lymphocytes.** *Cancer Research* 63, 8212-8220.
- D'Souza, S.M., Brown, I.R. (1998). **Constitutive expression of heat shock proteins Hsp90, Hsc70, Hsp70 and Hsp60 in neural and non-neural tissues of the rat during postnatal development.** *Cell Stress & Chaperones* 3, 188-199.
- D'Souza-Schorey, C., Clancy, J.W. (2012). **Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers.** *Genes & Development* 26, 1287-1299.
- Du, C., Chen, L., Zhang, H., Wang, Z., Liu, W., Xie, X., Xie, M. (2014). **Caveolin-1 limits the contribution of BKCa channel to MCF-7 breast cancer cell proliferation and invasion.** *International Journal of Molecular Sciences* 15, 20706-20722.
- Dulbecco, R., Freeman, G. (1959). **Plaque production by the polyoma virus.** *Virology* 8, 396-397.
- Ellis, J. (1987). **Proteins as molecular chaperones.** *Nature* 328, 378-379.
- Ellis, R.J., Hemmingsen, S.M. (1989). **Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures.** *Trends in Biochemical Sciences* 14, 339-342.
- Engelman, J.A., Zhang, X.L., Lisanti, M.P. (1999). **Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines.** *FEBS Letters* 448, 221-230.
- Erwig, L.P., Henson, P.M. (2008). **Clearance of apoptotic cells by phagocytes.** *Cell Death and Differentiation* 15, 243-250.
- Faure, O., Graff-Dubois, S., Bretaudeau, L., Derré, L., Gross, D.A., Alves, Pedro M.S., Cornet, S., Duffour, M.T., Chouaib, S., Miconnet, I. (2004). **Inducible Hsp70 as target of anticancer immunotherapy: Identification of HLA-A\*0201-restricted epitopes.** *International Journal of Cancer* 108, 863-870.
- Flaherty, K.M., DeLuca-Flaherty, C., McKay, D.B. (1990). **Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein.** *Nature* 346, 623-628.

- Flanagan, S.W., Ryan, A.J., Gisolfi, C.V., Moseley, P.L. (1995). **Tissue-specific HSP70 response in animals undergoing heat stress**. *American Journal of Physiology* 268, 28-32.
- Fortuna-Costa, A., Gomes, A.M., Kozlowski, E., Stelling, M., Pavão, M.S. (2014). **Extra-cellular galectin-3 in tumor progression and metastasis**. *Frontiers in Oncology* 4, 138.
- Frattoni, A., Fabbri, M., Valli, R., de Paoli, E., Montalbano, G., Gribaldo, L., Pasquali, F., Maserati, E. (2015). **High variability of genomic instability and gene expression profiling in different HeLa clones**. *Scientific Reports* 5, 15377.
- Galbiati, F., Volonte, D., Engelman, J.A., Watanabe, G., Burk, R., Pestell, R.G., Lisanti, M.P. (1998). **Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade**. *The EMBO Journal* 17, 6633-6648.
- Galva, C., Artigas, P., Gatto, C. (2012). **Nuclear Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase plays an active role in nucleoplasmic Ca<sup>2+</sup> homeostasis**. *Journal of Cell Science* 125, 6137-6147.
- Gargalovic, P., Dory, L. (2003). **Cellular apoptosis is associated with increased caveolin-1 expression in macrophages**. *Journal of Lipid Research* 44, 1622-1632.
- Garmyn, M., Mammone, T., Pupe, A., Gan, D., Declercq, L., Maes, D. (2001). **Human keratinocytes respond to osmotic stress by p38 map kinase regulated induction of HSP70 and HSP27**. *Journal of Investigative Dermatology* 117, 1290-1295.
- Gässler, C.S., Wiederkehr, T., Brehmer, D., Bukau, B., Mayer, M.P. (2001). **Bag-1M accelerates nucleotide release for human Hsc70 and Hsp70 and can act concentration-dependent as positive and negative cofactor**. *Journal of Biological Chemistry* 276, 32538-32544.
- Gässler, C.S., Buchberger, A., Laufen, T., Mayer, M.P., Schröder, H., Valencia, A., Bukau, B. (1998). **Mutations in the DnaK chaperone affecting interaction with the DnaJ cochaperone**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15229-15234.
- Gastpar, R., Gehrman, M., Bausero, M.A., Asea, A., Gross, C., Schroeder, J.A., Multhoff, G. (2005). **Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells**. *Cancer Research* 65, 5238-5247.
- Gehrman, M., Brunner, M., Pfister, K., Reichle, A., Kremmer, E., Multhoff, G. (2004). **Differential up-regulation of cytosolic and membrane-bound heat shock protein 70 in tumor cells by anti-inflammatory drugs**. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 10, 3354-3364.
- Gehrman, M., Pfister, K., Hutzler, P., Gastpar, R., Margulis, B., Multhoff, G. (2002). **Effects of antineoplastic agents on cytoplasmic and membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70) levels**. *Biological Chemistry* 383, 1715-1725.
- Gehrman, M., Stangl, S., Foulds, G.A., Oellinger, R., Breuninger, S., Rad, R., Pockley, A.G., Multhoff, G. (2014). **Tumor imaging and targeting potential of an Hsp70-derived 14-mer peptide**. *PloS one* 9, e105344.
- Genevaux, P., Georgopoulos, C., Kelley, W.L. (2007). **The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions**. *Molecular Microbiology* 66, 840-857.

- Gicquaud, C., Wong, P. (1994). **Mechanism of interaction between actin and membrane lipids: a pressure-tuning infrared spectroscopy study.** *Biochemical journal* 303(3), 769-774.
- Giepmans, B., van Ijzendoorn, S. (2009). **Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1788, 820-831.
- Gragerov, A., Gottesman, M.E. (1994). **Different peptide binding specificities of Hsp70 family members.** *Journal of Molecular Biology* 241, 133-135.
- Gragerov, A., Zeng, L., Zhao, X., Burkholder, W., Gottesman, M.E. (1994). **Specificity of DnaK-peptide binding.** *Journal of Molecular Biology* 235, 848-854.
- Greene, J.M., Larin, Z., Taylor, I.C., Prentice, H., Gwinn, K.A., Kingston, R.E. (1987). **Multiple basal elements of a human *hsp70* promoter function differently in human and rodent cell lines.** *Molecular and Cellular Biology* 7, 3646-3655.
- Ham, R.G. (1965). **Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 53, 288-293.
- Hantschel, M., Pfister, K., Jordan, A., Scholz, R., Andreesen, R., Schmitz, G., Schmetzer, H., Hiddemann, W., Multhoff, G. (2000). **Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients.** *Cell Stress & Chaperones* 5, 438-442.
- Haviv, H., Habeck, M., Kanai, R., Toyoshima, C., Karlisch, Steven J.D. (2013). **Neutral phospholipids stimulate Na,K-ATPase activity: a specific lipid-protein interaction.** *Journal of Biological Chemistry* 288, 10073-10081.
- He, K., Yan, X., Li, N., Dang, S., Xu, L., Zhao, B., Li, Z., Lv, Z., Fang, X., Zhang, Y. (2015). **Internalization of the TGF- $\beta$  type I receptor into caveolin-1 and EEA1 double-positive early endosomes.** *Cell Research* 25, 738-752.
- Imamoto, N., Kose, S. (2012). **Heat-shock stress activates a novel nuclear import pathway mediated by Hikeshi.** *Nucleus* 3, 422-428.
- Imperiale, M.J., Kao, H.T., Feldman, L.T., Nevins, J.R., Strickland, S. (1984). **Common control of the heat shock gene and early adenovirus genes: evidence for a cellular E1A-like activity.** *Molecular and Cellular Biology* 4, 867-874.
- Issels, R.D., Lindner, L.H., Verweij, J., Wust, P., Reichardt, P., Schem, B.C., Abdel-Rahman, S., Daugaard, S., Salat, C., Wendtner, C.M. (2010). **Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study.** *Lancet Oncology* 11, 561-570.
- Jiang, J., Prasad, K., Lafer, E.M., Sousa, R. (2005). **Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone.** *Molecular Cell* 20, 513-524.
- Jindal, S., Young, R.A. (1992). **Vaccinia virus infection induces a stress response that leads to association of Hsp70 with viral proteins.** *Journal of Virology* 66, 5357-5362.
- Jolly, C., Morimoto, R.I. (2000). **Role of heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death.** *Journal of the National Cancer Institute* 92, 1564-1572.
- Juhasz, K., Lipp, A., Nimmervoll, B., Sonnleitner, A., Hesse, J., Haselgruebler, T., Balogi, Z. (2013). **The complex function of Hsp70 in metastatic cancer.** *Cancers* 6, 42-66.

- Kampinga, H.H., Craig, E.A. (2010). **The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity**. *Nature reviews Molecular Cell Biology* 11, 579-592.
- Kampinga, H.H., Hageman, J., Vos, M.J., Kubota, H., Tanguay, R.M., Bruford, E.A., Cheetham, M.E., Chen, B., Hightower, L.E. (2009). **Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins**. *Cell Stress & Chaperones* 14, 105-111.
- Kang, P.J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E.A., Pfanner, N. (1990). **Requirement for Hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins**. *Nature* 348, 137-143.
- Kaur, J., Ralhan, R. (2000). **Induction of apoptosis by abrogation of HSP70 expression in human oral cancer cells**. *International journal of cancer* 85, 1-5.
- Kaur, P., Hurwitz, M.D., Krishnan, S., Asea, A. (2011). **Combined hyperthermia and radiotherapy for the treatment of cancer**. *Cancers* 3, 3799-3823.
- Keydar, I., Chen, L., Karby, S., Weiss, F.R., Delarea, J., Radu, M., Chaitcik, S., Brenner, H.J. (1979). **Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin**. *European Journal of Cancer* 15, 659-670.
- Kim, D., Somji, S., Garrett, S.H., Sens, M.A., Shukla, D., Sens, D.A. (2001). **Expression of hsp 27, hsp 60, hsc 70, and hsp 70 by immortalized human proximal tubule cells (HK-2) following exposure to heat shock, sodium arsenite, or cadmium chloride**. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 63, 475-493.
- Kim, J.W., Wieckowski, E., Taylor, D.D., Reichert, T.E., Watkins, S., Whiteside, T.L. (2005). **Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes**. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11, 1010-1020.
- Kityk, R., Kopp, J., Sinning, I., Mayer, M.P. (2012). **Structure and dynamics of the ATP-bound open conformation of Hsp70 chaperones**. *Molecular Cell* 48, 863-874.
- Kose, S., Imamoto, N. (2014). **Nucleocytoplasmic transport under stress conditions and its role in HSP70 chaperone systems**. *Biochimica et Biophysica Acta* 1840, 2953-2960.
- Kotoglou, P., Kalaitzakis, A., Vezyraki, P., Tzavaras, T., Michalis, L.K., Dantzer, F., Jung, J.U., Angelidis, C. (2009). **Hsp70 translocates to the nuclei and nucleoli, binds to XRCC1 and PARP-1, and protects HeLa cells from single-strand DNA breaks**. *Cell Stress & Chaperones* 14, 391-406.
- Kovalenko, E., Kanevskiy, L., Klinkova, A., Kuchukova, A., Streltsova, M., Telford, W., Sapozhnikov, A. (2012). **Stress-Induced Molecules in Regulation of NK Cell Activity**. *Cell Interaction*, InTechOpen. ISBN 978-953-51-0792-7.
- Krahling, S., Callahan, M.K., Williamson, P., Schlegel, R.A. (1999). **Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages**. *Cell Death and Differentiation* 6, 183-189.
- Kumar, D.P., Vorvis, C., Sarbeng, E.B., Cabra Ledesma, V.C., Willis, J.E., Liu, Q. (2011). **The four hydrophobic residues on the Hsp70 inter-domain linker have two distinct roles**. *Journal of Molecular Biology* 411, 1099-1113.

- Kurucz, I., Tombor, B., Prechl, J., Erdő, F., Hegedüs, E., Nagy, Z., Vitai, M., Korányi, L., László, L. (1999). **Ultrastructural localization of Hsp-72 examined with a new polyclonal antibody raised against the truncated variable domain of the heat shock protein.** *Cell Stress & Chaperones* 4, 139-152.
- Laemmli, U.K. (1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 227, 680-685.
- Landry, J.M., Pyl, P.T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M., Stütz, A.M., Jauch, A., Aiyar, R.S., Pau, G., Delhomme, N. (2013). **The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line.** *G3 (Bethesda, Md.)* 3, 1213-1224.
- Lee, S.W., Reimer, C.L., Oh, P., Campbell, D.B., Schnitzer, J.E. (1998). **Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells.** *Oncogene* 16, 1391-1397.
- Lee, T.H., D'Asti, E., Magnus, N., Al-Nedawi, K., Meehan, B., Rak, J. (2011). **Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer - the emerging science of cellular 'debris'.** *Seminars in Immunopathology* 33, 455-467.
- Leung, T.K., Hall, C., Rajendran, M., Spurr, N.K., Lim, L. (1992). **The human heat-shock genes HSPA6 and HSPA7 are both expressed and localize to chromosome 1.** *Genomics* 12, 74-79.
- Lima, L.G., Chammas, R., Monteiro, R.Q., Moreira, M.E., Barcinski, M.A. (2009). **Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner.** *Cancer Letters* 283, 168-175.
- Lindquist, S. (1986). **The heat-shock response.** *Annual Review of Biochemistry* 55, 1151-1191.
- Lindquist, S., Craig, E.A. (1988). **The heat-shock proteins.** *Annual Review of Genetics* 22, 631-677.
- Lingle, W.L., Lutz, W.H., Ingle, J.N., Maihle, N.J., Salisbury, J.L. (1998). **Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 2950-2955.
- Liou, S.N., Ding, X.Z., Kiang, J.G., Tsokos, G.C. (1997). **Overexpression of the heat shock protein 70 enhances the TCR/CD3- and Fas/Apo-1/CD95-mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells.** *Journal of Immunology* 158, 5668-5675.
- Liu, T., Daniels, C.K., Cao, S. (2012). **Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential.** *Pharmacology & Therapeutics* 136, 354-374.
- Lucey, B.P., Nelson-Rees, W.A., Hutchins, G.M. (2009). **Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination.** *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 133, 1463-1467.
- Lukyanov, P., Furtak, V., Ochieng, J. (2005). **Galectin-3 interacts with membrane lipids and penetrates the lipid bilayer.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338, 1031-1036.

- Luo, J., Solimini, N.L., Elledge, S.J. (2009). **Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction.** *Cell* 136, 823-837.
- Maeda, A., Ohguro, H., Maeda, T., Wada, I., Sato, N., Kuroki, Y., Nakagawa, T. (2000). **Aberrant expression of photoreceptor-specific calcium-binding protein (recoverin) in cancer cell lines.** *Cancer Research* 60, 1914-1920.
- Mahalka, A.K., Kirkegaard, T., Jukola, Laura T.I., Jäätelä, M., Kinnunen, Paavo K.J. (2014). **Human heat shock protein 70 (Hsp70) as a peripheral membrane protein.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1838, 1344-1361.
- Mambula, S.S., Calderwood, S.K. (2006). **Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes.** *Journal of Immunology* 177, 7849-7857.
- Mamelak, D., Mylvaganam, M., Whetstone, H., Hartmann, E., Lennarz, W., Wyrick, P.B., Raulston, J., Han, H., Hoffman, P., Lingwood, C.A. (2001). **Hsp70s contain a specific sulfogalactolipid binding site. Differential aglycone influence on sulfogalactosyl ceramide binding by recombinant prokaryotic and eukaryotic Hsp70 family members.** *Biochemistry* 40, 3572-3582.
- Maryanovich, M., Oberkovitz, G., Niv, H., Vorobiyov, L., Zaltsman, Y., Brenner, O., Lapidot, T., Jung, S., Gross, A. (2012). **The ATM-BID pathway regulates quiescence and survival of haematopoietic stem cells.** *Nature Cell Biology* 14, 535-541.
- Mathivanan, S., Fahner, C.J., Reid, G.E., Simpson, R.J. (2012). **ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids.** *Nucleic Acids Research* 40, 1241-4.
- Mathur, S.K., Sistonen, L., Brown, I.R., Murphy, S.P., Sarge, K.D., Morimoto, R.I. (1994). **Deficient induction of human *hsp70* heat shock gene transcription in Y79 retinoblastoma cells despite activation of heat shock factor 1.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 8695-8699.
- Mayer, M.P., Bukau, B. (2005). **Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 670-684.
- Mayer, M.P., Schröder, H., Rüdiger, S., Paal, K., Laufen, T., Bukau, B. (2000). **Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70.** *Nature Structural Biology* 7, 586-593.
- McCallister, C., Kdeiss, B., Nikolaidis, N. (2015). **HspA1A, a 70-kDa heat shock protein, differentially interacts with anionic lipids.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 467, 835-840.
- Melan, M.A., Sluder, G. (1992). **Redistribution and differential extraction of soluble proteins in permeabilized cultured cells. Implications for immunofluorescence microscopy.** *Journal of Cell Science* 101(4), 731-743.
- Michalak, S., Zaborowski, M., Osztynowicz, K., Piorunek, T., Batura-Gabryel, M., Spaczynski, M., Kozubski, W. (2013). **The Activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase as a Marker of Extracellular Vesicles in Cancer Patients Suspected to have Paraneoplastic Neurological Syndromes: Comparison of Two Isolation Methods.** *Journal of Clinical and Laboratory Investigation Updates* 1, 48-55



- Milarski, K.L., Morimoto, R.I. (1986). **Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 83, 9517-9521.
- Milarski, K.L., Morimoto, R.I. (1989). **Mutational analysis of the human HSP70 protein: distinct domains for nucleolar localization and adenosine triphosphate binding.** Journal of Cell Biology 109, 1947-1962.
- Milner, C.M., Campbell, R.D. (1990). **Structure and expression of the three MHC-linked *hsp70* genes.** Immunogenetics 32, 242-251.
- Minciacchi, V.R., Freeman, M.R., Di Vizio, D. (2015a). **Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes.** Seminars in Cell & Developmental Biology 40, 41-51.
- Minciacchi, V.R., You, S., Spinelli, C., Morley, S., Zandian, M., Aspuria, P.J., Cavallini, L., Ciardiello, C., Reis Sobreiro, M., Morello, M. (2015b). **Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles.** Oncotarget 6, 11327-11341.
- Misselwitz, B., Staack, O., Rapoport, T.A. (1998). **J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences.** Molecular Cell 2, 593-603.
- Montalbano, A.J., Theisen, C.S., Fibuch, E.E., Seidler, N.W. (2012). **Isoflurane Enhances the Moonlighting Activity of GAPDH: Implications for GABA A Receptor Trafficking.** International Scholarly Research Network ISRN Anesthesiology 2012, 1-7.
- Morange, M., Diu, A., Bensaude, O., Babinet, C. (1984). **Altered expression of heat shock proteins in embryonal carcinoma and mouse early embryonic cells.** Molecular and Cellular Biology 4, 730-735.
- Morello, M., Minciacchi, V.R., de Candia, P., Yang, J., Posadas, E., Kim, H., Griffiths, D., Bhowmick, N., Chung, L.W., Gandellini, P. (2013). **Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA.** Cell Cycle 12, 3526-3536.
- Morimoto, R., Fodor, E. (1984). **Cell-specific expression of heat shock proteins in chicken reticulocytes and lymphocytes.** Journal of Cell Biology 99, 1316-1323.
- Moro, F., Fernández-Sáiz, V., Muga, A. (2004). **The lid subdomain of DnaK is required for the stabilization of the substrate-binding site.** Journal of Biological Chemistry 279, 19600-19606.
- Mosser, D.D., Morimoto, R.I. (2004). **Molecular chaperones and the stress of oncogenesis.** Oncogene 23, 2907-2918.
- Multhoff, G. (2007). **Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance.** Methods 43, 229-237.
- Multhoff, G., Botzler, C., Jennen, L., Schmidt, J., Ellwart, J., Issels, R. (1997). **Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells.** Journal of Immunology 158, 4341-4350.
- Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Müller, E., Meier, T., Wilmanns, W., Issels, R.D. (1995). **A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells.** International Journal of Cancer 61, 272-279.

- Multhoff, G., Hightower, L.E. (2011). **Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies.** *Cell Stress & Chaperones* 16, 251-255.
- Murphy, M.E. (2013). **The HSP70 family and cancer.** *Carcinogenesis* 34, 1181-1188.
- Myung, J.K., Afjehi-Sadat, L., Felizardo-Cabatic, M., Slavc, I., Lubec, G. (2004). **Expressional patterns of chaperones in ten human tumor cell lines.** *Proteome Science* 2, 8.
- Nadin, S.B., Sottile, M.L., Montt-Guevara, M.M., Gauna, G.V., Daguerre, P., Leuzzi, M., Gago, F.E., Ibarra, J., Cuello-Carrión, F.D., Ciocca, D.R. (2014). **Prognostic implication of HSPA (HSP70) in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy.** *Cell Stress & Chaperones* 19, 493-505.
- Nelson, R.J., Ziegelhoffer, T., Nicolet, C., Werner-Washburne, M., Craig, E.A. (1992). **The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis.** *Cell* 71, 97-105.
- Nillegoda, N.B., Kirstein, J., Szlachcic, A., Berynsky, M., Stank, A., Stengel, F., Arnsburg, K., Gao, X., Scior, A., Aebersold, R. (2015). **Crucial HSP70 co-chaperone complex unlocks metazoan protein disaggregation.** *Nature* 524, 247-251.
- Nirdé, P., Derocq, D., Maynadier, M., Chambon, M., Basile, I., Gary-Bobo, M., Garcia, M. (2010). **Heat shock cognate 70 protein secretion as a new growth arrest signal for cancer cells.** *Oncogene* 29, 117-127.
- Noessner, E., Gastpar, R., Milani, V., Brandl, A., Hutzler, P.J., Kuppner, M.C., Roos, M., Kremmer, E., Asea, A., Calderwood, S.K. (2002). **Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells.** *Journal of Immunology* 169, 5424-5432.
- Nollen, E.A., Brunsting, J.F., Roelofsen, H., Weber, L.A., Kampinga, H.H. (1999). **In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance.** *Molecular and Cellular Biology* 19, 2069-2079.
- Nylandsted, J., Rohde, M., Brand, K., Bastholm, L., Elling, F., Jäättelä, M. (2000). **Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 7871-7876.
- Oehler, R., Pusch, E., Zellner, M., Dungal, P., Hergovics, N., Homoncik, M., Eliassen, M.M., Brabec, M., Roth, E. (2001). **Cell type-specific variations in the induction of hsp70 in human leukocytes by feverlike whole body hyperthermia.** *Cell Stress & Chaperones* 6, 306-315.
- Oh, H.J., Easton, D., Murawski, M., Kaneko, Y., Subjeck, J.R. (1999). **The chaperoning activity of hsp110. Identification of functional domains by use of targeted deletions.** *Journal of Biological Chemistry* 274, 15712-15718.
- Pan, S., Wang, R., Zhou, X., Corvera, J., Kloc, M., Sifers, R., Gallick, G.E., Lin, S.H., Kuang, J. (2008a). **Extracellular Alix regulates integrin-mediated cell adhesions and extracellular matrix assembly.** *The EMBO Journal* 27, 2077-2090.
- Pandya, M.J., Bendz, H., Manzenrieder, F., Noessner, E., Kessler, H., Buchner, J., Issels, R.D. (2009). **Interaction of human heat shock protein 70 with tumor-associated peptides.** *Biological Chemistry* 390, 305-312.

- Paoletti, A., Moudjou, M., Paintrand, M., Salisbury, J.L., Bornens, M. (1996). **Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles.** *Journal of Cell Science* 109, 3089-3102.
- Parsell, D.A., Lindquist, S. (1994). **Heat Shock Proteins and Stress Tolerance.** Cold Spring Harbor Monograph Archive 26, 457-494.
- Pawlik, A., Nowak, J.M., Grzanka, D., Gackowska, L., Michalkiewicz, J., Grzanka, A. (2013). **Hyperthermia induces cytoskeletal alterations and mitotic catastrophe in p53-deficient H1299 lung cancer cells.** *Acta Histochemica* 115, 8-15.
- Pelham, H.R. (1986). **Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins.** *Cell* 46, 959-961.
- Pierpaoli, E.V., Sandmeier, E., Schönfeld, H.J., Christen, P. (1998). **Control of the DnaK chaperone cycle by substoichiometric concentrations of the co-chaperones DnaJ and GrpE.** *Journal of Biological Chemistry* 273, 6643-6649.
- Pinaud, F., Dahan, M. (2011). **Targeting and imaging single biomolecules in living cells by complementation-activated light microscopy with split-fluorescent proteins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 201-210.
- Pontén, J., Saksela, E. (1967). **Two established *in vitro* cell lines from human mesenchymal tumours.** *International Journal of Cancer* 2, 434-447.
- Qi, R., Sarbeng, E.B., Liu, Q., Le, K.Q., Xu, X., Xu, H., Yang, J., Wong, J.L., Vorvis, C., Hendrickson, W.A. (2013a). **Allosteric opening of the polypeptide-binding site when an Hsp70 binds ATP.** *Nature Structural & Molecular Biology* 20, 900-907.
- Qi, W., White, M.C., Choi, W., Guo, C., Dinney, C., McConkey, D.J., Siefker-Radtke, A. (2013b). **Inhibition of inducible heat shock protein-70 (hsp72) enhances bortezomib-induced cell death in human bladder cancer cells.** *PloS one* 8, e69509.
- Ramp, U., Mahotka, C., Heikau, S., Shibata, T., Grimm, M.O., Willers, R., Gabbert, H.E. (2007). **Expression of heat shock protein 70 in renal cell carcinoma and its relation to tumor progression and prognosis.** *Histology and Histopathology* 22, 1099-1107.
- Ran, Q., Wadhwa, R., Kawai, R., Kaul, S.C., Sifers, R.N., Bick, R.J., Smith, J.R., Pereira-Smith, O.M. (2000). **Extramitochondrial localization of Mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 275, 174-179.
- Ran, R., Lu, A., Zhang, L., Tang, Y., Zhu, H., Xu, H., Feng, Y., Han, C., Zhou, G., Rigby, A.C. (2004). **Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling.** *Genes & Development* 18, 1466-1481.
- Raposo, G., Stoorvogel, W. (2013). **Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends.** *The Journal of Cell Biology* 200, 373-383.
- Ricci, L., Williams, K.P. (2008). **Development of fluorescence polarization assays for the molecular chaperone Hsp70 family members: Hsp72 and DnaK.** *Current Chemical Genomics* 2, 90-95.
- Riedl, S., Rinner, B., Asslaber, M., Schaidler, H., Walzer, S., Novak, A., Lohner, K., Zweglick, D. (2011). **In search of a novel target - phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 2638-2645.

- Ritossa, F. (1962). **A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*.** *Experientia* 18, 571-573.
- Ritossa, F. (1964). **Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of *Drosophila*.** *Experimental Cell Research* 35, 601-607.
- Ritossa, F. (1996). **Discovery of the heat shock response.** *Cell Stress & Chaperones* 1, 97-98.
- Rohde, M., Dugaard, M., Jensen, M.H., Helin, K., Nylandsted, J., Jäättelä, M. (2005). **Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms.** *Genes & Development* 19, 570-582.
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., Anderson, R.G. (1992). **Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats.** *Cell* 68, 673-682.
- Rubin, R.W., Quillen, M., Corcoran, J.J., Ganapathi, R., Krishan, A. (1982). **Tubulin as a major cell surface protein in human lymphoid cells of leukemic origin.** *Cancer Research* 42, 1384-1389.
- Rüdiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J., Bukau, B. (1997). **Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries.** *The EMBO Journal* 16, 1501-1507.
- Ryan, M.J., Johnson, G., Kirk, J., Fuerstenberg, S.M., Zager, R.A., Torok-Storb, B. (1994). **HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney.** *Kidney International* 45, 48-57.
- Saibil, H. (2013). **Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14, 630-642.
- Schägger, H. (2006). **Tricine-SDS-PAGE.** *Nature Protocols* 1, 16-22.
- Schägger, H., von Jagow, G. (1987). **Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.** *Analytical Biochemistry* 166, 368-379.
- Schild, H., Arnold-Schild, D., Lammert, E., Rammensee, H.G. (1999). **Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes.** *Current Opinion in Immunology* 11, 109-113.
- Schilling, D., Gehrmann, M., Steinem, C., de Maio, A., Pockley, A.G., Abend, M., Molls, M., Multhoff, G. (2009). **Binding of heat shock protein 70 to extracellular phosphatidylserine promotes killing of normoxic and hypoxic tumor cells.** *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 2467-2477.
- Schlecht, R., Erbse, A.H., Bukau, B., Mayer, M.P. (2011). **Mechanics of Hsp70 chaperones enables differential interaction with client proteins.** *Nature Structural & Molecular Biology* 18, 345-351.
- Schnell, U., Dijk, F., Sjollem, K.A., Giepmans, N.G. (2012). **Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging.** *Nature Methods* 9, 152-158.
- Scieglinska, D., Piglowski, W., Chekan, M., Mazurek, A., Krawczyk, Z. (2011). **Differential expression of HSPA1 and HSPA2 proteins in human tissues; tissue microarray-based immunohistochemical study.** *Histochemistry and Cell Biology* 135, 337-350.

- Segawa, K., Suzuki, J., Nagata, S. (2011). **Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *108*, 19246-19251.
- Shida, M., Arakawa, A., Ishii, R., Kishishita, S., Takagi, T., Kukimoto-Niino, M., Sugano, S., Tanaka, A., Shirouzu, M., Yokoyama, S. (2010). **Direct inter-subdomain interactions switch between the closed and open forms of the Hsp70 nucleotide-binding domain in the nucleotide-free state**. Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography *66*, 223-232.
- Shin, B.K., Wang, H., Yim, A.M., Le Naour, F., Brichory, F., Jang, J.H., Zhao, R., Puravs, E., Tra, J., Michael, C.W. (2003). **Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function**. Journal of Biological Chemistry *278*, 7607-7616.
- Sidibe, A., Yin, X., Tarelli, E., Xiao, Q., Zampetaki, A., Xu, Q., Mayr, M. (2007). **Integrated membrane protein analysis of mature and embryonic stem cell-derived smooth muscle cells using a novel combination of CyDye/biotin labeling**. Molecular & Cellular Proteomics *6*, 1788-1797.
- Slepenkov, S.V., Witt, S.N. (1998). **Peptide-induced conformational changes in the molecular chaperone DnaK**. Biochemistry *37*, 16749-16756.
- Smith, R.S., Meyers, D.A., Peters, S.P., Moore, W.C., Wenzel, S.A., Bleecker, E.R., Hawkins, G.A. (2007). **Sequence analysis of HSPA1A and HSPA1B in a multi-ethnic study population**. Journal of DNA Sequencing and Mapping *18*, 47-53.
- Soltys, B.J., Gupta, R.S. (1996). **Immunoelectron microscopic localization of the 60-kDa heat shock chaperonin protein (Hsp60) in mammalian cells**. Experimental Cell Research *222*, 16-27.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M. (1973). **A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma**. Journal of the National Cancer Institute *51*, 1409-1416.
- Sousa, R., Lafer, E.M. (2006). **Keep the traffic moving: mechanism of the Hsp70 motor**. Traffic *7*, 1596-1603.
- Stangl, S., Gehrmann, M., Dressel, R., Alves, F., Dullin, C., Themelis, G., Ntziachristos, V., Staebelin, E., Walch, A., Winkelmann, I. (2011). **In vivo imaging of CT26 mouse tumours by using cmHsp70.1 monoclonal antibody**. Journal of Cellular and Molecular Medicine *15*, 874-887.
- Stangl, S., Varga, J., Freysoldt, B., Trajkovic-Arsic, M., Siveke, J.T., Greten, F.R., Ntziachristos, V., Multhoff, G. (2014). **Selective in vivo imaging of syngeneic, spontaneous, and xenograft tumors using a novel tumor cell-specific Hsp70 peptide-based probe**. Cancer Research *74*, 6903-6912.
- Stevens, S.Y., Cai, S., Pellicchia, M., Zuiderweg, E.R. (2003). **The solution structure of the bacterial HSP70 chaperone protein domain DnaK (393-507) in complex with the peptide NRLLLTG**. Protein Science: A Publication of the Protein Society *12*, 2588-2596.
- Straus, D.B., Walter, W.A., Gross, C.A. (1988). **Escherichia coli heat shock gene mutants are defective in proteolysis**. Genes & Development *2*, 1851-1858.

- Swain, J.F., Dinler, G., Sivendran, R., Montgomery, D.L., Stotz, M., Gierasch, L.M. (2007). **Hsp70 chaperone ligands control domain association via an allosteric mechanism mediated by the interdomain linker**. *Molecular Cell* 26, 27-39.
- Taddei, M.L., Giannoni, E., Comito, G., Chiarugi, P. (2013). **Microenvironment and tumor cell plasticity: an easy way out**. *Cancer Letters* 341, 80-96.
- Tahir, S.A., Yang, G., Ebara, S., Timme, T.L., Satoh, T., Li, L., Goltsov, A., Ittmann, M., Morrisett, J.D., Thompson, T.C. (2001). **Secreted caveolin-1 stimulates cell survival / clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer**. *Cancer Research* 61, 3882-3885.
- Taira, T., Narita, T., Iguchi-Ariga, S.M., Ariga, H. (1997). **A novel G1-specific enhancer identified in the human heat shock protein 70 gene**. *Nucleic Acids Research* 25, 1975-1983.
- Taylor, D.D., Chou, I.N., Black, P.H. (1983). **Isolation of plasma membrane fragments from cultured murine melanoma cells**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 113, 470-476.
- Terlecki, G., Czapińska, E., Rogozik, K., Lisowski, M., Gutowicz, J. (2006). **Investigation of the interaction of pig muscle lactate dehydrogenase with acidic phospholipids at low pH**. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758, 133-144.
- Theodorakis, N.G., Morimoto, R.I. (1987). **Posttranscriptional regulation of Hsp70 expression in human cells: effects of heat shock, inhibition of protein synthesis, and adenovirus infection on translation and mRNA stability**. *Molecular and Cellular Biology* 7, 4357-4368.
- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., Amigorena, S. (2001). **Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles**. *Journal of Immunology* 166, 7309-7318.
- Tilly, K., McKittrick, N., Zylicz, M., Georgopoulos, C. (1983). **The dnaK protein modulates the heat-shock response of *Escherichia coli***. *Cell* 34, 641-646.
- Tissières, A., Mitchell, H.K., Tracy, U.M. (1974). **Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs**. *Journal of Molecular Biology* 84, 389-398.
- Tompkins, A.J., Chatterjee, D., Maddox, M., Wang, J., Arciero, E., Camussi, G., Quesenberry, P.J., Renzulli, J.F. (2015). **The emergence of extracellular vesicles in urology: fertility, cancer, biomarkers and targeted pharmacotherapy**. *Journal of Extracellular Vesicles* 4, 23815.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.
- Udono, H., Srivastava, P.K. (1993). **Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity**. *Journal of Experimental Medicine* 178, 1391-1396.

- Vega, V.L., Rodríguez-Silva, M., Frey, T., Gehrmann, M., Diaz, J.C., Steinem, C., Multhoff, G., Arispe, N., de Maio, A. (2008). **Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages.** *Journal of Immunology* 180, 4299-4307.
- Vogel, M., Bukau, B., Mayer, M.P. (2006a). **Allosteric regulation of Hsp70 chaperones by a proline switch.** *Molecular Cell* 21, 359-367.
- Vogel, M., Mayer, M.P., Bukau, B. (2006b). **Allosteric regulation of Hsp70 chaperones involves a conserved interdomain linker.** *Journal of Biological Chemistry* 281, 38705-38711.
- Volonte, D., Galbiati, F., Lisanti, M.P. (1999). **Visualization of caveolin-1, a caveolar marker protein, in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras. The subcellular distribution of caveolin-1 is modulated by cell-cell contact.** *FEBS Letters* 445, 431-439.
- von Jagow, G., Revzin, A. (2013). **A Practical Guide to Membrane Protein Purification.** Elsevier Academic Press. ISBN: 978-0127255507.
- von Mach, T.M. (2013). **pH-abhängige strukturelle und funktionelle Variationen des  $\beta$ -Galactosid-bindenden Proteins Galectin-3.** Philipps-Universität Marburg.
- von Mach, T.M., Carlsson, M.C., Straube, T., Nilsson, U., Leffler, H., Jacob, R. (2014). **Ligand binding and complex formation of galectin-3 is modulated by pH variations.** *Biochemical Journal* 457, 107-115.
- Wang, T.F., Chang, J.H., Wang, C. (1993). **Identification of the peptide binding domain of hsc70. 18-Kilodalton fragment located immediately after ATPase domain is sufficient for high affinity binding.** *Journal of Biological Chemistry* 268, 26049-26051.
- Williams, G.T., Morimoto, R.I. (1990). **Maximal stress-induced transcription from the human HSP70 promoter requires interactions with the basal promoter elements independent of rotational alignment.** *Molecular and Cellular Biology* 10, 3125-3136.
- Williams, T.M., Lisanti, M.P. (2004). **The caveolin proteins.** *Genome Biology* 5, 214.
- Wright, P.K., Jones, S.B., Arden, N., Ward, R., Clarke, R.B., Sotgia, F., Lisanti, M.P., Landberg, G., Lamb, R. (2014). **17 $\beta$ -estradiol regulates giant vesicle formation via estrogen receptor- $\alpha$  in human breast cancer cells.** *Oncotarget* 5, 3055-3065.
- Wu, B., Hunt, C., Morimoto, R. (1985). **Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70.** *Molecular and Cellular Biology* 5, 330-341.
- Wu, B.J., Kingston, R.E., Morimoto, R.I. (1986). **Human HSP70 promoter contains at least two distinct regulatory domains.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 629-633.
- Wu, B.J., Morimoto, R.I. (1985). **Transcription of the human *hsp70* gene is induced by serum stimulation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 6070-6074.
- Wu, C.A., Tsujita, M., Hayashi, M., Yokoyama, S. (2004). **Probucol inactivates ABCA1 in the plasma membrane with respect to its mediation of apolipoprotein binding and high density lipoprotein assembly and to its proteolytic degradation.** *Journal of Biological Chemistry* 279, 30168-30174.

- Yang, Z., Zhuang, L., Szatmary, P., Wen, L., Sun, H., Lu, Y., Xu, Q., Chen, X. (2015). **Upregulation of heat shock proteins (HSPA12A, HSP90B1, HSPA4, HSPA5 and HSPA6) in tumour tissues is associated with poor outcomes from HBV-related early-stage hepatocellular carcinoma.** *International Journal of Medical Sciences* 12, 256-263.
- Young, J.C. (2014). **The role of the cytosolic HSP70 chaperone system in diseases caused by misfolding and aberrant trafficking of ion channels.** *Disease Models & Mechanisms* 7, 319-329.
- Zeng, X.C., Bhasin, S., Wu, X., Lee, J.G., Maffi, S., Nichols, C.J., Lee, K.J., Taylor, J.P., Greene, L.E., Eisenberg, E. (2004). **Hsp70 dynamics in vivo: effect of heat shock and protein aggregation.** *Journal of Cell Science* 117, 4991-5000.
- Zhang, H.G., Grizzle, W.E. (2011). **Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression.** *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17, 959-964.
- Zhang, Y., Zuiderweg, E. (2004). **The 70-kDa heat shock protein chaperone nucleotide-binding domain in solution unveiled as a molecular machine that can reorient its functional subdomains.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10272-10277.
- Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W.F., Gragerov, A., Ogata, C.M., Gottesman, M.E., Hendrickson, W.A. (1996). **Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK.** *Science* 272, 1606-1614.
- Zocco, D., Ferruzzi, P., Cappello, F., Kuo, W.P., Fais, S. (2014). **Extracellular vesicles as shuttles of tumor biomarkers and anti-tumor drugs.** *Frontiers in Oncology* 4, 267.
- Zorzi, E., Bonvini, P. (2011). **Inducible Hsp70 in the regulation of cancer cell survival: analysis of chaperone induction, expression and activity.** *Cancers* 3, 3921-3956.



## 7 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
Alix	ALG-2-interagierendes Protein X
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
CFL	5(6)-Carboxyfluorescein
BAX	Bcl-2-assoziiertes Protein X
Bcl-2	<i>B-Cell Lymphoma Two Regulator Protein</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
C / G / YFP	<i>Cyan / Green / Yellow Fluorescent Protein</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DR	<i>Death Receptor</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EV	Extrazelluläres Vesikel
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FasL	Fas-Ligand
FM	Fluoreszenzmikroskopie
FKS	Fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
hH <sub>2</sub> O	hochreines Wasser
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSF	Hitzeschockfaktor
HSP	Hitzeschockprotein
Hsc70	<i>Heat Shock Cognate 71 kDa Protein</i>

Hsp60 / 70 / 90	Hitzeschockprotein 60 / 70 / 90 Kilodalton
IKK	I-Kappa-B-Kinase-Komplex
K <sup>+</sup>	Kaliumion
kDa	Kilodalton
KLSM	Konfokales <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskop
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LDH	Laktat-Dehydrogenase
NBD	Nukleotidbindedomäne
NEF	<i>Nucleotide Exchange Factor</i>
NF-KB	Nukleärer Transkriptionsfaktor Kappa-B
mAk	monoklonaler Antikörper
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney (Cells)</i>
mRNS	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumion
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MVBs	<i>Multivesicular Bodies</i>
MW	<i>Molecular Weight</i>
pAk	polyklonale Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP-1	Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Eins
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PET	Polyethylenterephthalat
PFA	Paraformaldehyd
PI	Proteinase-Inhibitor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
PSG	Penicillin, Streptomycin, Glutamin
PVDS	Polyvinylidenfluorid
rpm	<i>Revolutions per Minute</i>
RNS	Ribonukleinsäuren
RT	Raumtemperatur
SBD	Substratbindedomäne

SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
sec	Sekunde
SV	<i>Shedding Vesicle</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TRAIL	Tumornekrosefaktor-verwandter, Apoptose-induzierender Ligand
Tricin	N-(Tri[hydroxymethyl]methyl)glycin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TMV	<i>Tumor-derived Microvesicle</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TPP	<i>Tumor Cell-penetrating Peptide-based Probe</i>
Tween-20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
%p	Prozentpunkte

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

2.1	Domänenstruktur von Hsp70 am Beispiel von DnaK.	8
2.2	Konformation von Hsp70 im ADP- und im ATP-gebundenen Zustand.	10
2.3	Ablauf des kanonischen Chaperon-Zyklus am Beispiel der Hsp70-Kernmaschinerie von <i>Escherichia coli</i> .	13
2.4	Vergleich der Domänenarchitektur humaner Hsp70-Chaperone.	14
2.5	Lokalisation von Hsp70 bei humanen HeLa-Zervixkarzinom- und murinen 4T1-Mammakarzinom-Zellen.	22
4.1	Die differentielle Zentrifugation ermöglicht eine Anreicherung peripherer und integraler Membranproteine.	55
4.2	Die Mammakarzinom-Zelllinien T47D und MCF7 zeigen eine höhere basale Hsp70-Expressionsintensität, als die Osteosarkom-Zelllinie U2OS.	57
4.3	Stressinduziert ändern sich die prozentualen Verhältnisse zwischen zytosolisch lokalisiertem und Membran-assoziiertem beziehungsweise in subzellulären Kompartimenten enthaltenem Hsp70 und Hsc70 bei T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen nicht.	59
4.4	Durch einen Hitzeschock wird die Expression von Alix, Galektin-3 und Hsc70 bei allen drei Zelllinien, die von GAPDH nur bei MCF7- und U2OS-Zellen beeinflusst.	63
4.5	Stressinduziert akkumuliert Hsp70 zeitgleich in den Zytosol- und Membranfraktionen aller analysierten Zelllinien, jedoch mit für die jeweilige Zelllinie charakteristischen Steigerungsraten.	68
4.6	T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen exponieren Hsp70 und Caveolin-1 auf der extraplasmatischen Seite der Zellmembran. Nach Stressexposition ändert sich die Verteilung dieser Proteine nicht.	71
4.7	Auf den Oberflächen ungestresster und gestresster T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen akkumulieren integrales und peripheres Hsp70 in Clustern.	74
4.8	Die subzelluläre Lokalisation von Hsp70 wird bei T47D-, MCF7- und U2OS-Tumorzellen durch thermischen Stress nicht erkennbar beeinflusst.	78
4.9	Auf der Oberfläche ungestresster Tumorzellen sind Alix sowie Caveolin-1 und die Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasen meist weiträumiger als Hsp70 verteilt, Centrin, GAPDH sowie LDH und $\alpha$ -Tubulin hingegen zeigen ein den Hsp70-Clustern entsprechendes Lokalisationsmuster.	82
4.10	Auf den Oberflächen ungestresster Tumorzellen kolokalisieren GAPDH, $\alpha$ -Tubulin und Alix mit Hsp70.	86
4.11	Das multifunktionelle Protein Alix ist auf Oberfläche von Tumorzellen weiträumiger verteilt als Hsp70, akkumuliert aber nur nahe der Hsp70-Cluster.	89

4.12	Galektin-3 ist auf Oberfläche von Mammarkarzinom-Zellen nur geringfügig weiträumiger verteilt als Hsp70, kolokalisiert mit diesem in eng begrenzten Bereichen und lässt sich durch Laktose nicht entfernen.	91
4.13	Auch immortalisierte HK2-Zellen exprimieren und exponieren Hsp70, GAPDH, LDH und $\alpha$ -Tubulin in Clustern, die in Form und Größe den Proteinclustern auf den Tumorzellen entsprechen.	94
4.14	Fluorochrom-gekoppelte Substrat- und Kontrollpeptide interagieren mit Komponenten der Plasmamembran von Mammarkarzinom-Zellen.	96
4.15	Fluorochrom-gekoppelte Substrat- und Kontrollpeptide sind auf den Oberflächen von Mammarkarzinom-Zellen detektierbar.	97
4.16	Mit 5(6)-Carboxyfluorescein gekoppelte Substrat- und Kontrollpeptide sowie das Fluorochrom selbst interagieren mit Komponenten der Plasmamembran von Mammarkarzinom-Zellen.	99
9.1	Die $\beta$ -Aktin-Expression wird bei T47D- und MCF7-Zellen durch einen Hitzeschock beeinflusst.	150
9.2	Ein Hitzeschock kann bei T47D-, MCF7- oder U2OS-Zellen auch Auswirkungen auf die Expression der Proteine Aktin, $\alpha$ -Tubulin, GAPDH, Alix, Galektin-3, $\beta$ -Catenin und Hsp60 haben.	151
9.3	Bei T47D-, MCF7- sowie U2OS-Zellen wird die Expression von Hsp60 und Hsp90 durch einen nichtletalen Hitzeschock beeinflusst.	155
9.4	Hsp70 und Hsp90 kolokalisieren auf den Oberflächen von MCF7-Zellen und akkumulieren in Clustern. T47D- und U2OS-Zellen benötigen nach der Aussaat bis zu 48 Stunden für die Bildung der Hsp70-Cluster.	158
9.5	Die durch einen Hitzeschock induzierten Hsp70-Expressionssteigerungen lassen sich durch Quantifizierung der Signalintensitäten immunfluoreszenzmikroskopischer Bilder nicht erfassen.	160
9.6	Ergänzung zu Abbildung 4.8 "Die subzelluläre Lokalisation von Hsp70 wird bei T47D- sowie MCF7- und U2OS-Tumorzellen durch thermischen Stress nicht erkennbar beeinflusst".	161
9.7	Ergänzung zu Abbildung 4.9 "Auf der Oberfläche ungestresster Tumorzellen sind Alix sowie Caveolin-1 und die $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen meist weiträumiger als Hsp70 verteilt, Centrin, GAPDH sowie LDH und $\alpha$ -Tubulin hingegen zeigen ein den Hsp70-Clustern entsprechendes Lokalisationsmuster".	166
9.8	Ergänzung zu Abbildung 4.10 "Auf den Oberflächen ungestresster Tumorzellen kolokalisieren GAPDH, $\alpha$ -Tubulin und Alix mit Hsp70".	176
9.9	Hsp70 und Galektin-3 kolokalisieren auf den Oberflächen von MCF7-Zellen und akkumulieren in Clustern.	179
9.10	Ergänzung zu Abbildung 4.12 "Galektin-3 ist auf Oberfläche von Mammarkarzinom-Zellen nur geringfügig weiträumiger verteilt als Hsp70, kolokalisiert mit diesem in eng begrenzten Bereichen und lässt sich durch Laktose nicht entfernen".	181

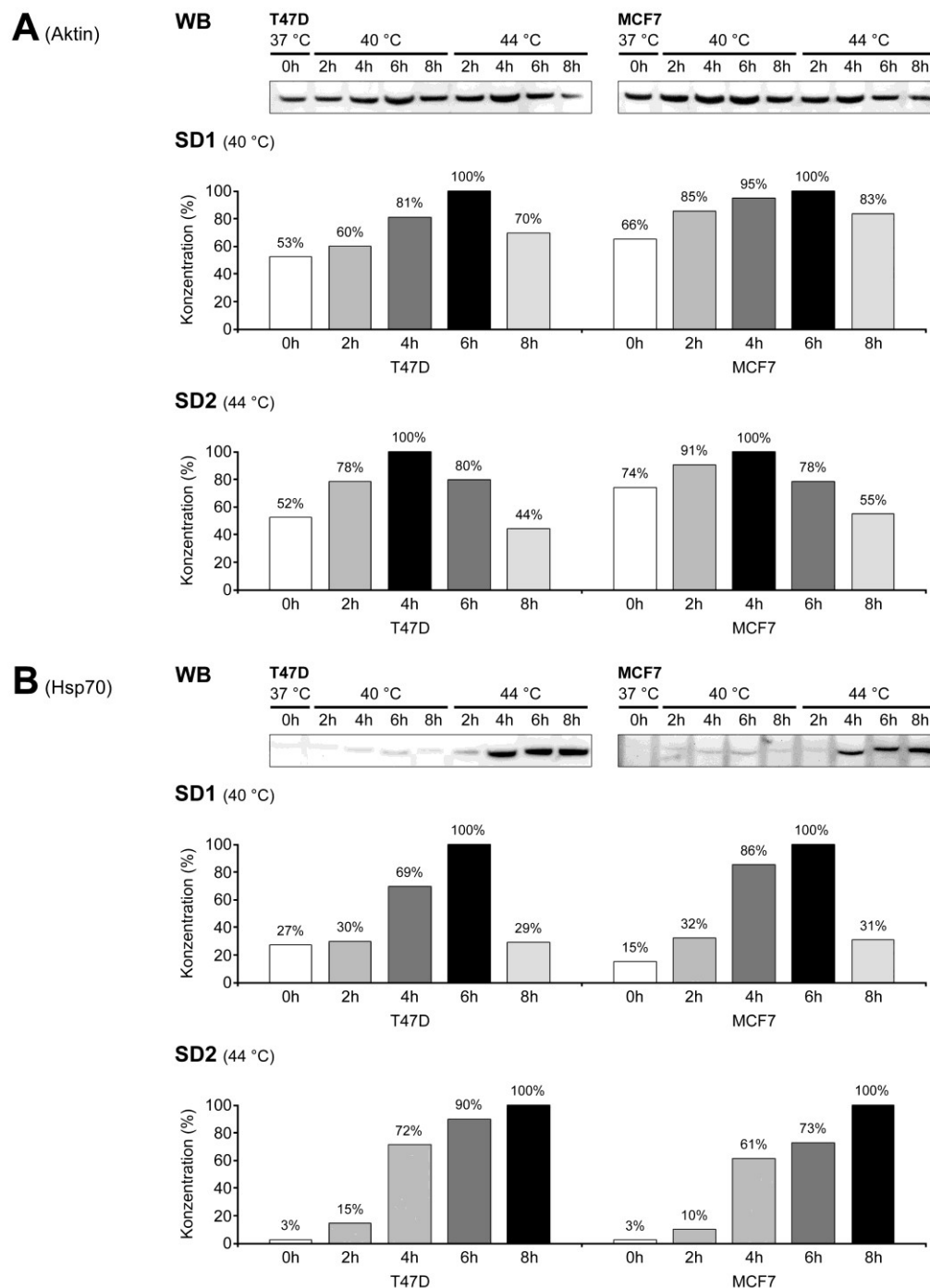
9.11	Ergänzung zu Abbildung 4.13 "Auch immortalisierte HK2-Zellen exprimieren und exponieren Hsp70, GAPDH, LDH und $\alpha$ -Tubulin in Clustern, die in Form und Größe den Proteinclustern auf den Tumorzellen entsprechen".	183
9.12	In den Zellkernen ungestresster HeLa-Zellen ist Hsp70 nicht detektierbar. In den Kernen ungestresster U2OS-Zellen ist Hsp70 detektierbar, Hsc70 aber kaum nachweisbar.	186

## 8.2 Tabellenverzeichnis

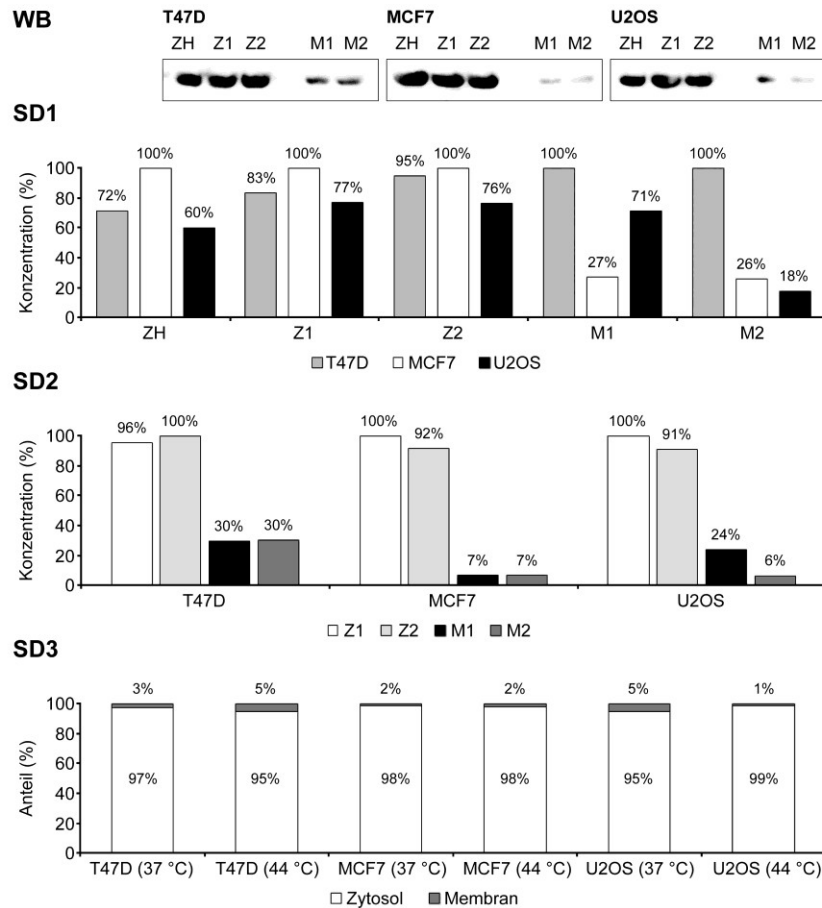
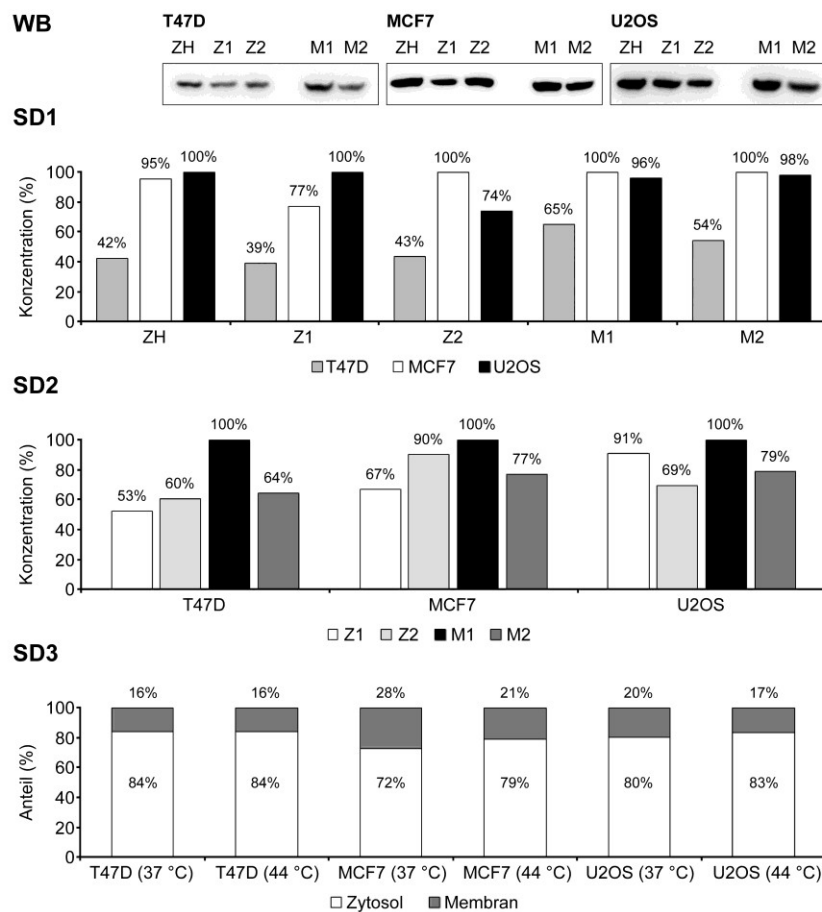
2.1	Familien der Hitzeschockproteine sowie Beispiele für Nomenklatur, Lokalisation und Funktion einzelner Proteine bei <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ( <i>S. cerevisiae</i> ), <i>Pisum sativum</i> ( <i>P. sativum</i> ) und <i>Homo sapiens</i> ( <i>H. sapiens</i> ).	6
2.2	Derzeit gebräuchliche Nomenklatur, ursprüngliche beziehungsweise alternative Bezeichnungen und bislang bekannte Lokalisation der von <i>Homo sapiens</i> exprimierten Chaperone der HSP70-Familie.	15
3.1	Geräte und Software.	28
3.2	Basismedien, Medienzusätze, Chemikalien, Reagenzien und Materialien.	30
3.3	Antikörper und Peptide, genutzte Verdünnungen und Konzentrationen.	33
3.4	Zusammensetzung der Desinfektionslösungen.	35
3.5	Zusammensetzung der Kulturmedien.	38
3.6	Zusammensetzung von Zellkultur-Puffer und Dissoziations-Lösung.	39
3.7	Zusammensetzung der Kryomedien.	40
3.8	Zusammensetzung von Homogenisierungs- und Proteaseinhibitions-Lösung.	41
3.9	Zusammensetzung des Probenpuffers.	43
3.10	Zusammensetzung der Tricin-SDS-PAGE-Lösungen.	44
3.11	Zusammensetzung der Lösungen für Trenn- (9,8 %) und Sammelgel (4,1 %).	45
3.12	Zusammensetzung der Westernblot-Lösungen.	46
3.13	Zusammensetzung von Membranfarbstoff-, Peptid- und Laktose-Lösungen.	49
3.14	Zusammensetzung der Mikroskopie-Puffer und -Lösungen.	50
3.15	Zusammensetzung von Lyse-Puffer und Fluorimetrie-Peptid-Lösung.	52

## 9 Anlagen

### 9.1 Ergänzende Abbildungen

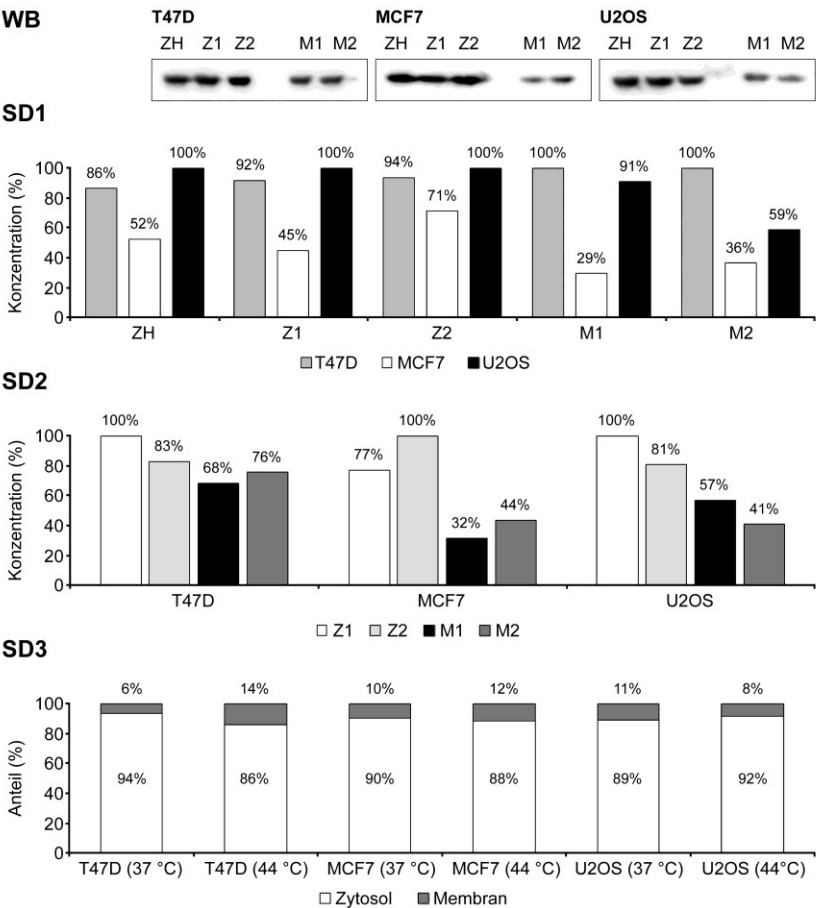


**Abbildung 9.1: Die  $\beta$ -Aktin-Expression wird bei T47D- und MCF7-Zellen durch einen Hitzeschock beeinflusst.** Ungestresste (Null Stunden, 37 °C) und gestresste Zellen (40 °C oder 44 °C, 25 Minuten) nach verschiedenen Erholungsperioden (37 °C, zwei bis acht Stunden) wurden chemisch lysiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt, die Proben (je 80 Mikrogramm Gesamtproteingehalt) gelelektrophoretisch aufgetrennt, die Proteine auf Polyvinylidenfluorid-Membranen übertragen und die Zielproteine  $\beta$ -Aktin (A) und Hsp70 (B) unter Nutzung der Primärantikörper sc-59569 (Hsp70) und 4967 ( $\beta$ -Aktin) sequentiell immunologisch markiert und detektiert. Nach densitometrischer Quantifizierung der Westernblots (WB) wurde die Bande der höchsten Intensität jeder Bandengruppe als 100 % definiert und die relativen Werte der anderen Banden basierend auf dieser Definition errechnet ( $n = 1,0$ ). Die Säulendiagramme repräsentieren die sich infolge eines Hitzeschocks von 40 °C (SD1) oder 44 °C (SD2) ergebenden Konzentrationsänderungen. Die Prozentwerte sind zur besseren Vergleichbarkeit oberhalb der einzelnen Säulen zusätzlich angegeben.

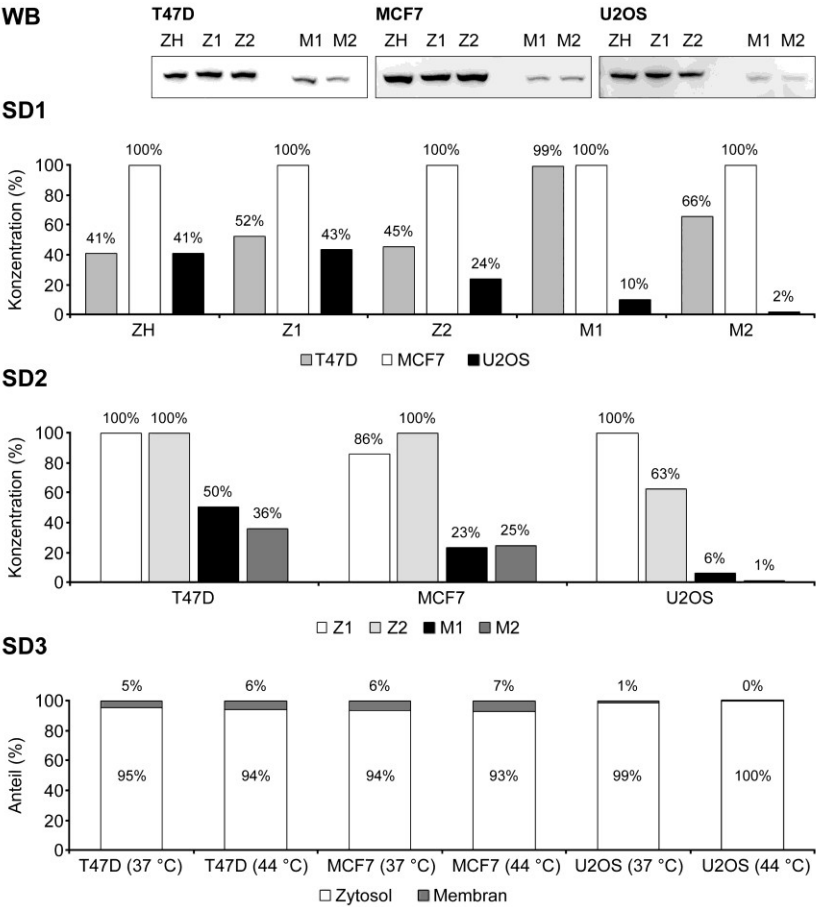
**A** (Aktin)**B** (α-Tubulin)

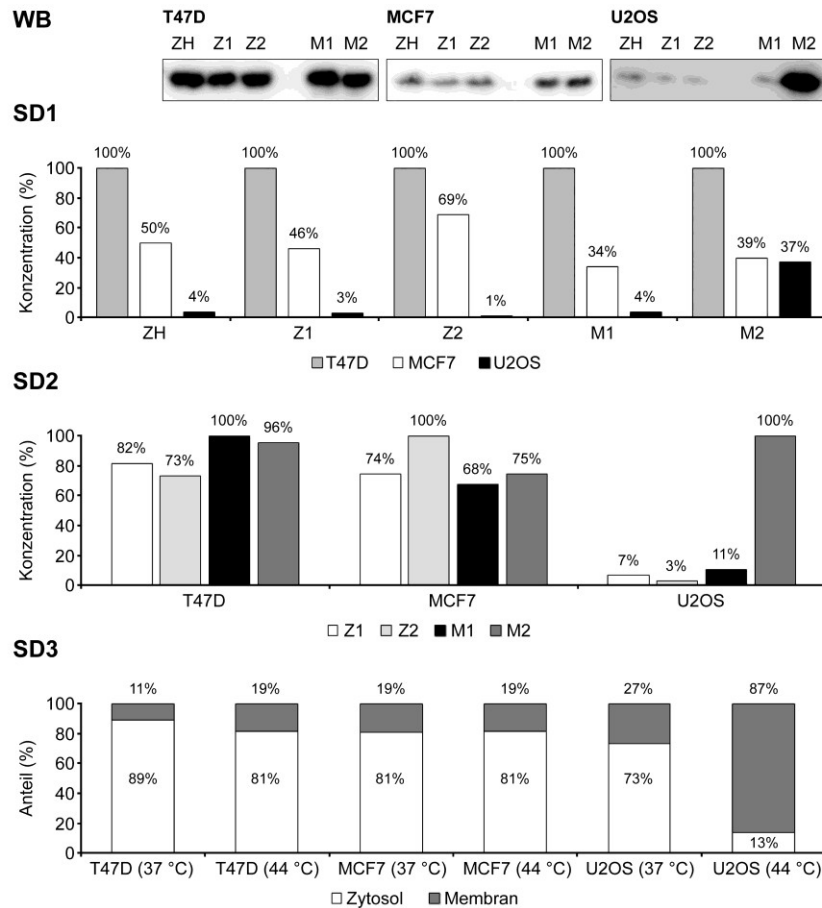
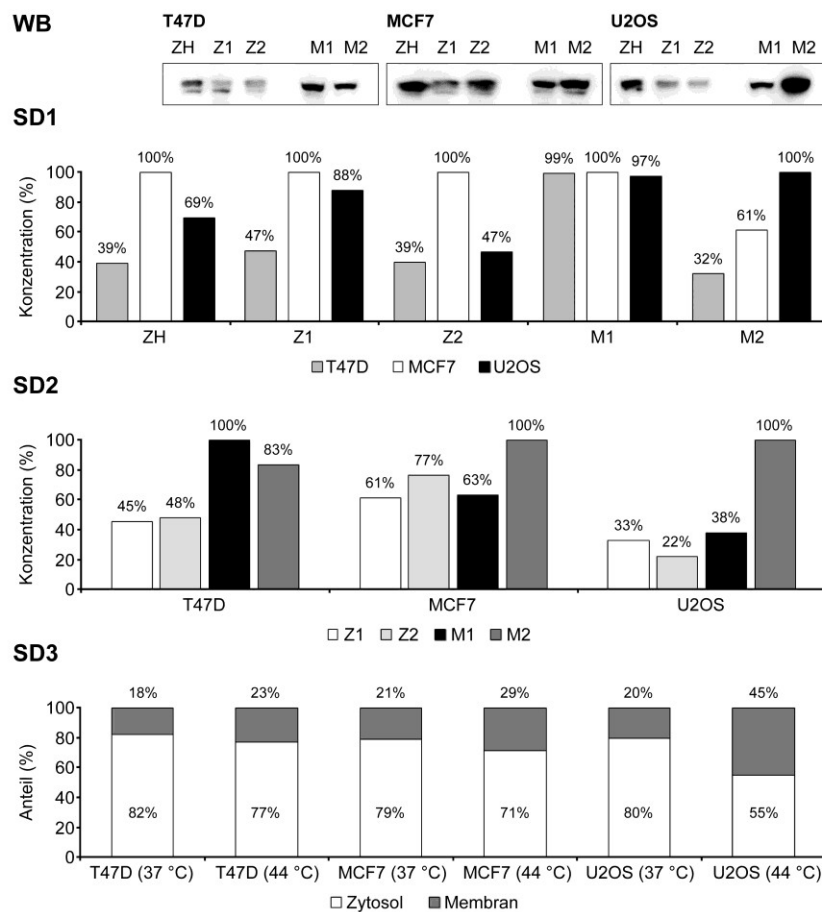


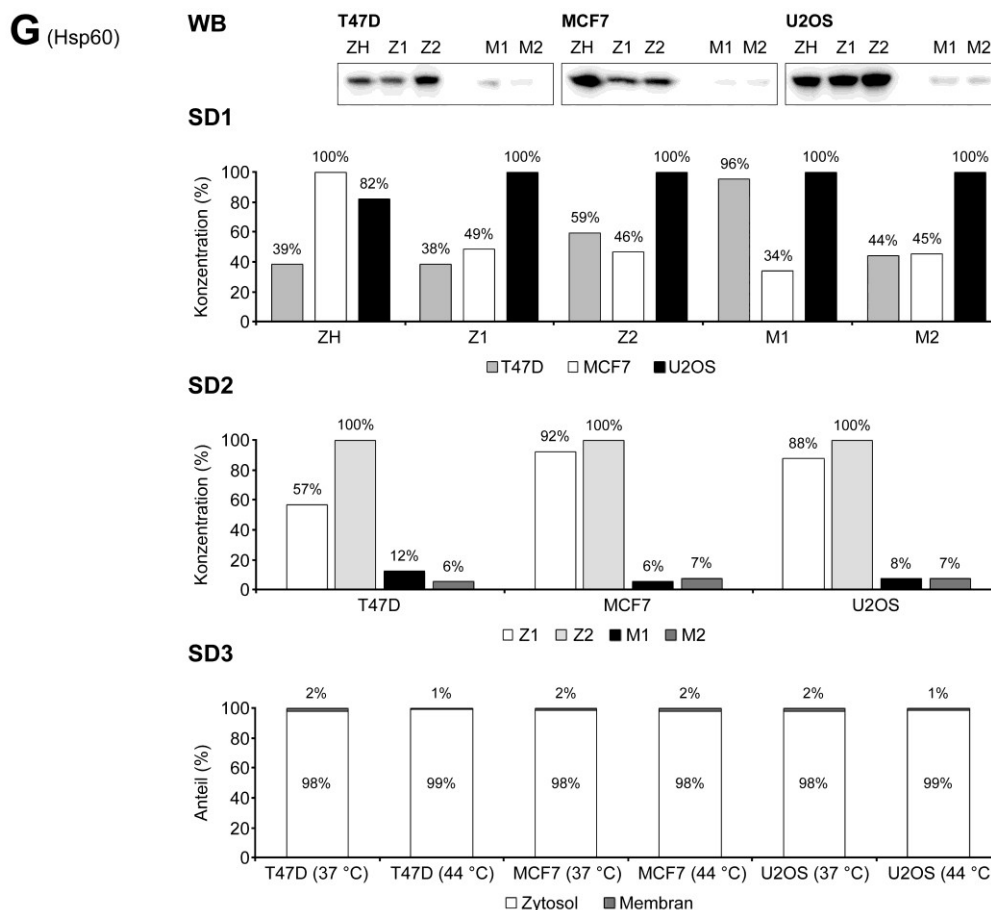
C (GAPDH)



D (Alix)



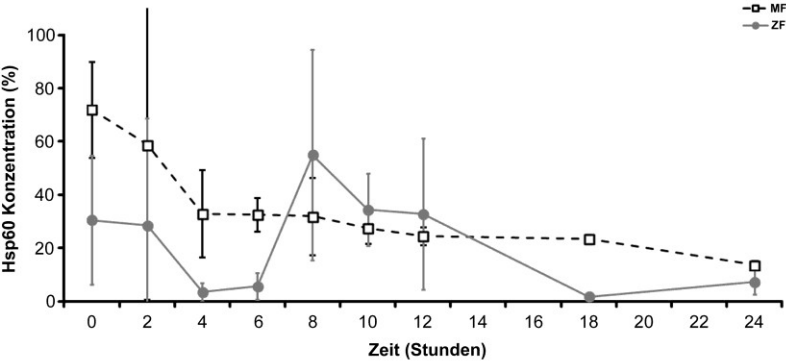
**E** (Galektin-3)**F** ( $\beta$ -Catenin)



**Abbildung 9.2: Ein Hitzeschock kann bei T47D-, MCF7- oder U2OS-Zellen auch Auswirkungen auf die Expression der Proteine Aktin,  $\alpha$ -Tubulin, GAPDH, Alix, Galektin-3,  $\beta$ -Catenin und Hsp60 haben.** Zellkernfreie Homogenate (ZH) ungestresster (ZH, Z1, M1; 37 °C) und gestresster Zellen (Z2, M2; 44 °C, 25 Minuten; vier Stunden Erholungszeit bei 37 °C) wurden in Zytosol- (Z1, Z2) und Membranfraktionen (M1, M2) getrennt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine (je 13 Mikrogramm Gesamtprotein-gehalt) und Übertragung derselben auf Polyvinylidenfluorid-Membranen wurden die Zielproteine unter Nutzung folgender Primärantikörper sowie entsprechender Sekundärantikörper sequentiell immunologisch markiert beziehungsweise detektiert: (A) Aktin: Ab-5; (B)  $\alpha$ -Tubulin: sc-53029; (C) GAPDH: 1D4; (D) Alix: sc-99010; (E) Galektin-3: sc-23938; (F)  $\beta$ -Catenin: 610153; (G) Hsp60: ab13532. Die resultierenden Banden der entsprechenden Westernblots (WB) wurden densitometrisch quantifiziert, je nach angestrebtem Vergleich umgerechnet und als Säulendiagramme (SD) aufbereitet (n = 1,0). SD1: Vergleich der Zielproteinkonzentrationen der Zelllinien nach Probentyp (jeweils ZH, Z1, Z2, M1, M2 der drei Zelllinien gemeinsam). SD2: Vergleich der Zielproteinkonzentrationen der Probentypen nach Zelllinie (jeweils ZH, Z1, Z2, M1, M2 der einzelnen Zelllinie). SD3: Vergleich des Zielproteingehalts von Zytosol- (weiß) und Membranfraktionen (grau). Im Falle von SD1 und SD2 wurden jeweils die Banden mit den höchsten Intensitäten einer jeden Bandengruppe als 100 % definiert und die relativen Werte der anderen Banden dementsprechend umgerechnet. Bei SD3 wurden die Resultate der Quantifizierungen anhand der bekannten Verdünnungsfaktoren mathematisch korrigiert, die Werte der einzelnen Fraktionspaare addiert, als 100 % definiert und darauf basierend die prozentualen Anteile der Zielproteine der Fraktionen errechnet. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die entsprechenden Prozentwerte oberhalb der einzelnen Säulen zusätzlich angegeben.

**A** (Hsp60)

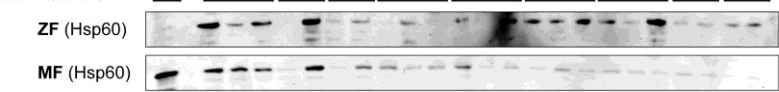
**DG** (T47D)



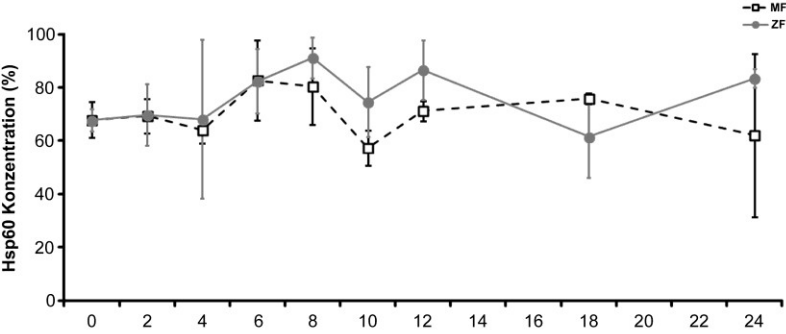
**TB** (T47D)

F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	NS	NS	NS
MF	0h → 6h	-39 +/- 19 %p	*
MF	0h → 24h	-58 +/- 18 %p	**

**WB** (T47D)



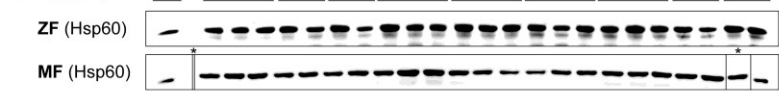
**DG** (MCF7)



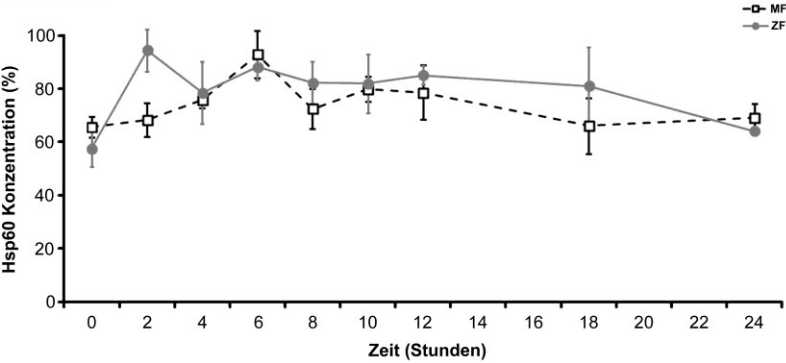
**TB** (MCF7)

F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	0h → 8h	+23 +/- 9 %p	**
ZF	0h → 24h	+16 +/- 5 %p	*
MF	NS	NS	NS

**WB** (MCF7)



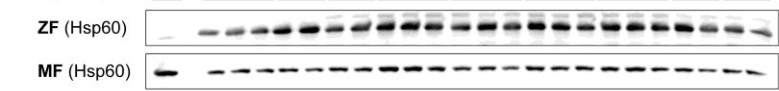
**DG** (U2OS)



**TB** (U2OS)

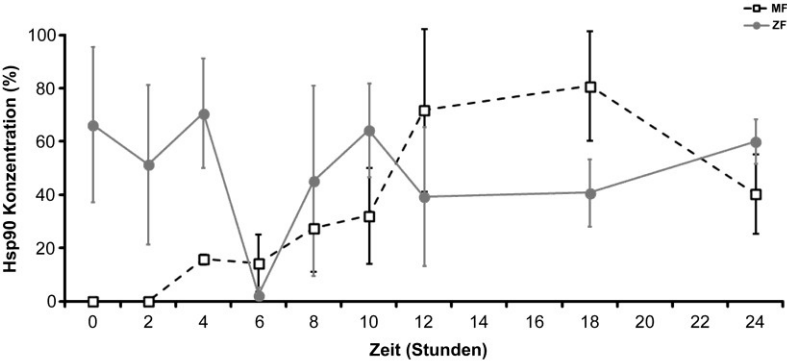
F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	0h → 2h	+37 +/- 10 %p	**
ZF	0h → 12h	+28 +/- 8 %p	*
ZF	2h → 24h	-30 +/- 8 %p	**
MF	0h → 6h	+27 +/- 10 %p	*
MF	6h → 18h	-27 +/- 14 %p	*

**WB** (U2OS)



B (Hsp90)

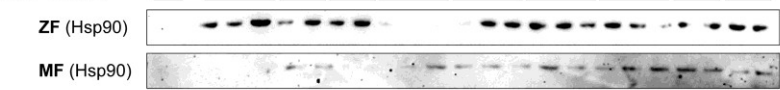
DG (T47D)



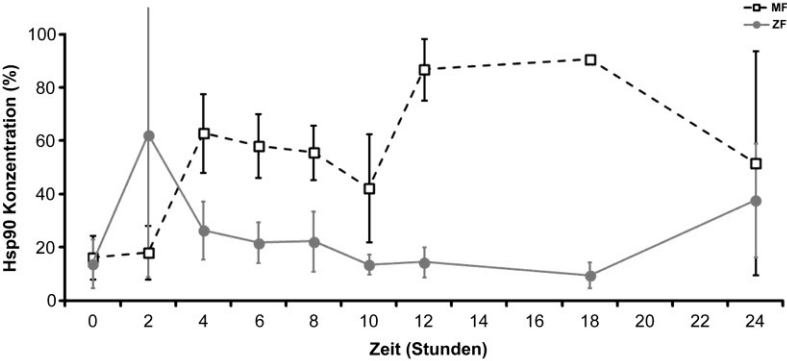
TB (T47D)

F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	NS	NS	NS
MF	0h → 12h	+72 +/- 31 %p	**
MF	0h → 18h	+81 +/- 21 %p	**
MF	4h → 12h	+56 +/- 31 %p	*
MF	4h → 18h	+65 +/- 21 %p	*
MF	2h → 12h	+72 +/- 31 %p	*
MF	2h → 18h	+81 +/- 21 %p	**
MF	6h → 12h	+58 +/- 32 %p	*
MF	6h → 18h	+66 +/- 23 %p	*

WB (T47D)



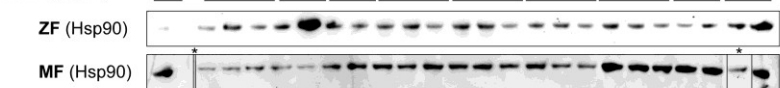
DG (MCF7)



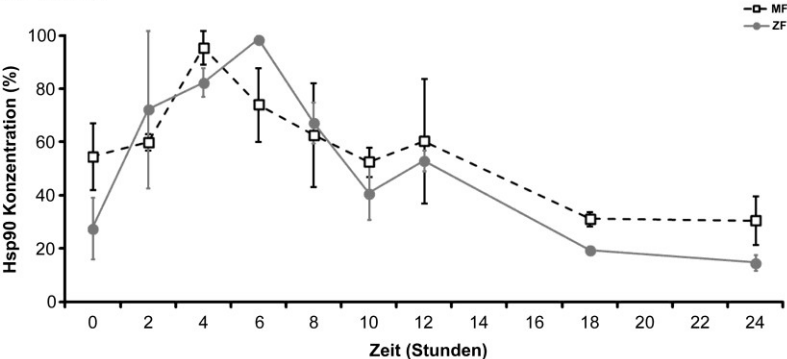
TB (MCF7)

F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	NS	NS	NS
MF	0h → 4h	+47 +/- 17 %p	*
MF	0h → 12h	+71 +/- 14 %p	**
MF	0h → 18h	+75 +/- 8 %p	**
MF	2h → 12h	+69 +/- 16 %p	*
MF	2h → 18h	+73 +/- 11 %p	*

WB (MCF7)



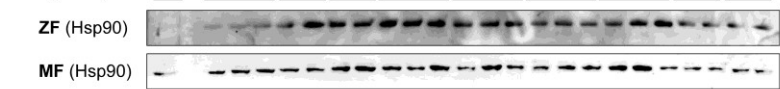
DG (U2OS)



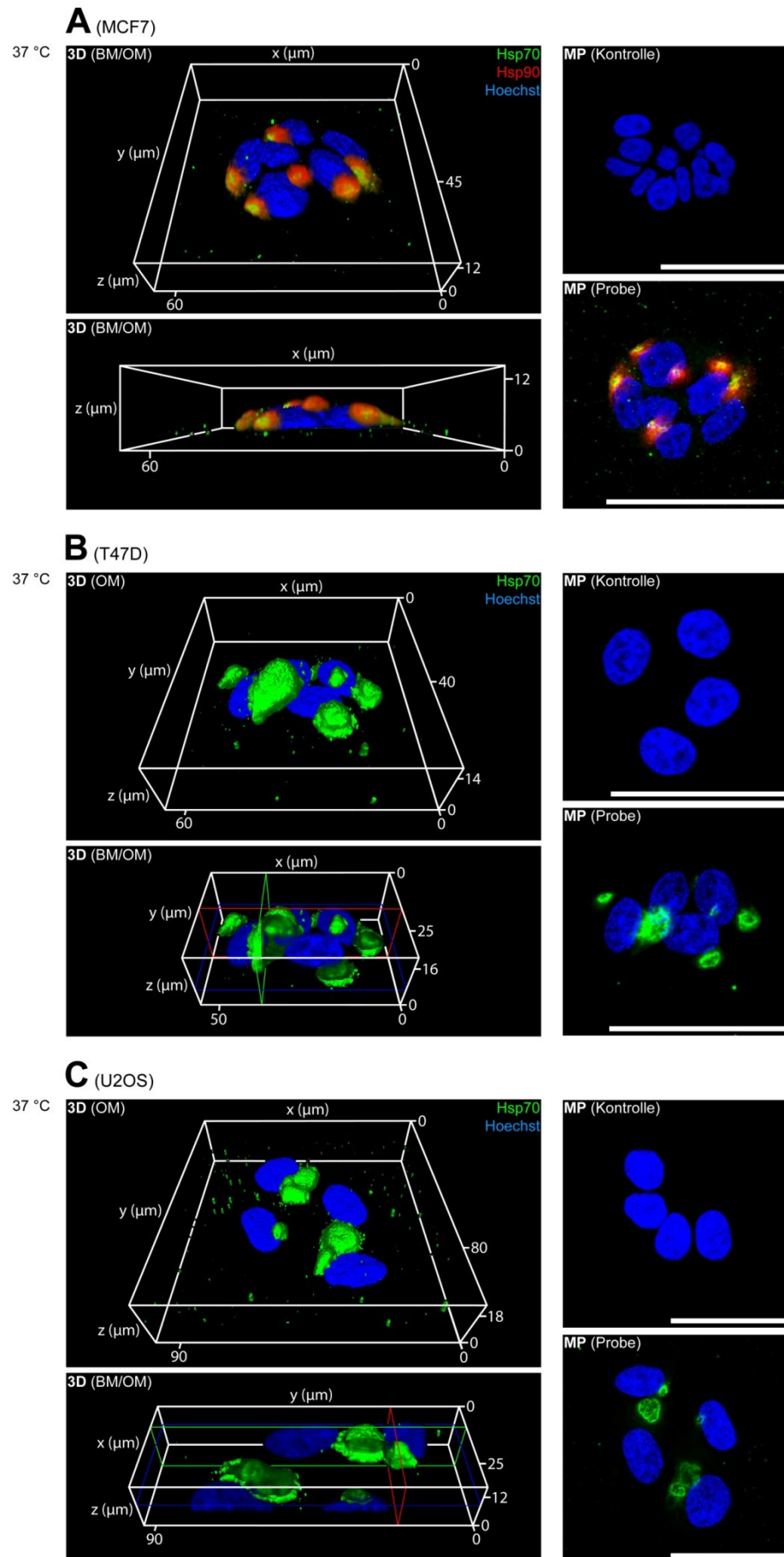
TB (U2OS)

F	Zeitraum	Differenz	P
ZF	0h → 2h	+45 +/- 32 %p	*
ZF	0h → 4h	+55 +/- 13 %p	**
ZF	0h → 6h	+71 +/- 12 %p	***
ZF	0h → 8h	+40 +/- 14 %p	*
ZF	2h → 18h	-53 +/- 30 %p	**
ZF	2h → 24h	-58 +/- 30 %p	**
ZF	4h → 10h	-42 +/- 11 %p	*
ZF	4h → 18h	-63 +/- 6 %p	**
ZF	4h → 24h	-68 +/- 6 %p	***
ZF	6h → 10h	-58 +/- 10 %p	***
ZF	6h → 12h	-46 +/- 4 %p	**
ZF	6h → 18h	-79 +/- 2 %p	***
ZF	6h → 24h	-84 +/- 3 %p	***
ZF	8h → 18h	-48 +/- 8 %p	**
ZF	8h → 24h	-53 +/- 8 %p	**
ZF	12h → 24h	-38 +/- 5 %p	*
MF	0h → 4h	+41 +/- 14 %p	*
MF	4h → 10h	-43 +/- 8 %p	*
MF	4h → 18h	-64 +/- 7 %p	*
MF	4h → 24h	-65 +/- 11 %p	*

WB (U2OS)

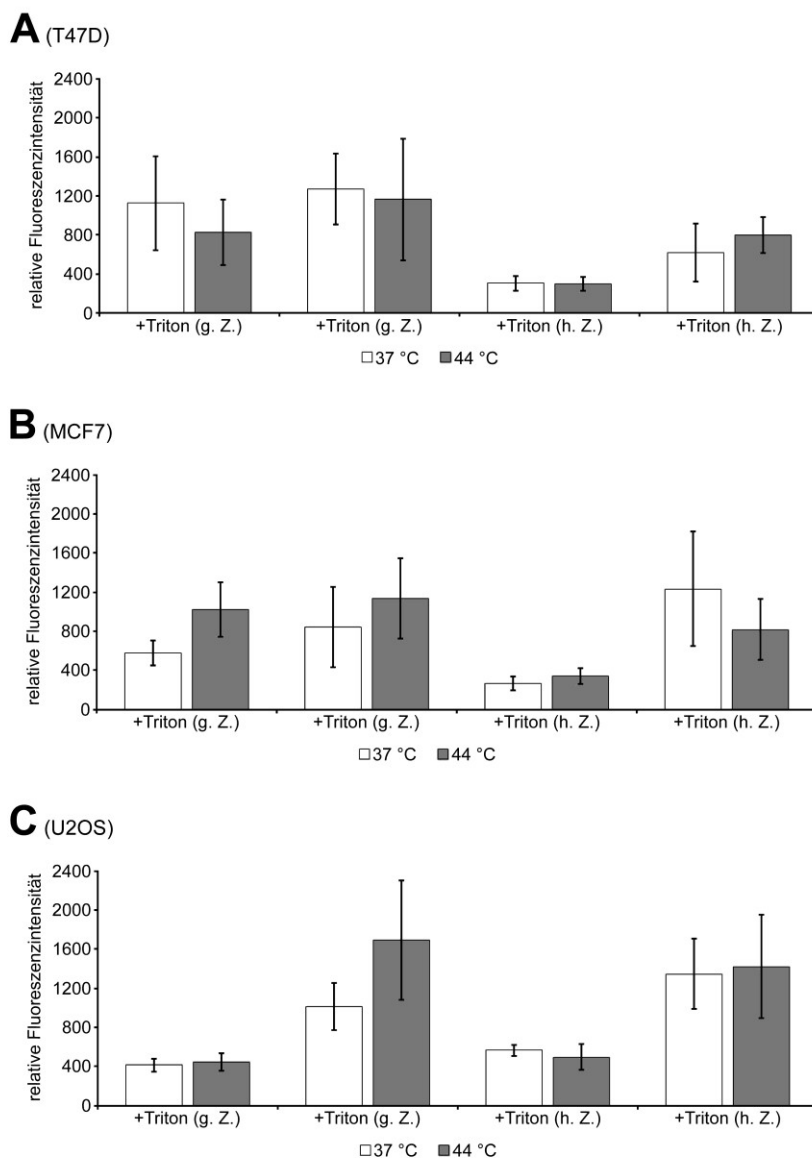


**Abbildung 9.3: Bei T47D-, MCF7- sowie U2OS-Zellen wird die Expression von Hsp60 und Hsp90 durch einen nichtletalen Hitzeschock beeinflusst.** Proben ungestresster (Null Stunden) und gestresster Zellen (44 °C, 25 Minuten) nach unterschiedlichen Erholungsperioden (37 °C, zwei bis 24 Stunden) wurden homogenisiert und durch differentielle Zentrifugation in zellkernfreie Zytosolfractionen (ZF; durchgehende graue Linien und Kreise) und Membranfractionen (MF; gestrichelte schwarze Linien und Vierecke) getrennt. Die in den Fractionen enthaltenen Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Polyvinylidenfluorid-Membranen übertragen und die Zielproteine Hsp60 (**A**) und Hsp90 (**B**) sequentiell immunologisch markiert beziehungsweise detektiert. Um die resultierenden Bandenintensitätswerte der einzelnen Westernblots miteinander vergleichen zu können, wurden jeweils die Intensitäten aller Banden eines Blots densitometrisch quantifiziert, die Bande mit der höchsten Intensität des Blots als 100 % definiert und die relativen Werte der anderen Banden basierend auf dieser Definition errechnet. Abschließend wurden die Daten einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen und nach Bonferroni korrigiert, um statistisch signifikante Werte sowie die sich aus diesen ergebenden Differenzen auch bei geringen Intensitätsunterschieden identifizieren zu können. Die Diagramme (DG) zeigen die Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen;  $n \leq 3,0$ ) der Westernblots (WB). Die Tabellen (TB) zeigen die sich innerhalb der angegebenen Zeiträumen ergebenden Differenzen statistisch signifikanter Konzentrationsänderungen (\* =  $P \leq 0,05$ ; \*\* =  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $P \leq 0,001$ ) als Prozentpunkte (%p). Um das zur digitalen Bildgebung genutzten Detektionssystem auf Abbildungsfehler zu prüfen, wurde im Falle der Membranfractionen der Zelllinie MCF7 die Position einer einzelnen Probe variiert, welche in der Abbildung zur besseren Übersicht an der korrekten Position dargestellt ist (|\*|).

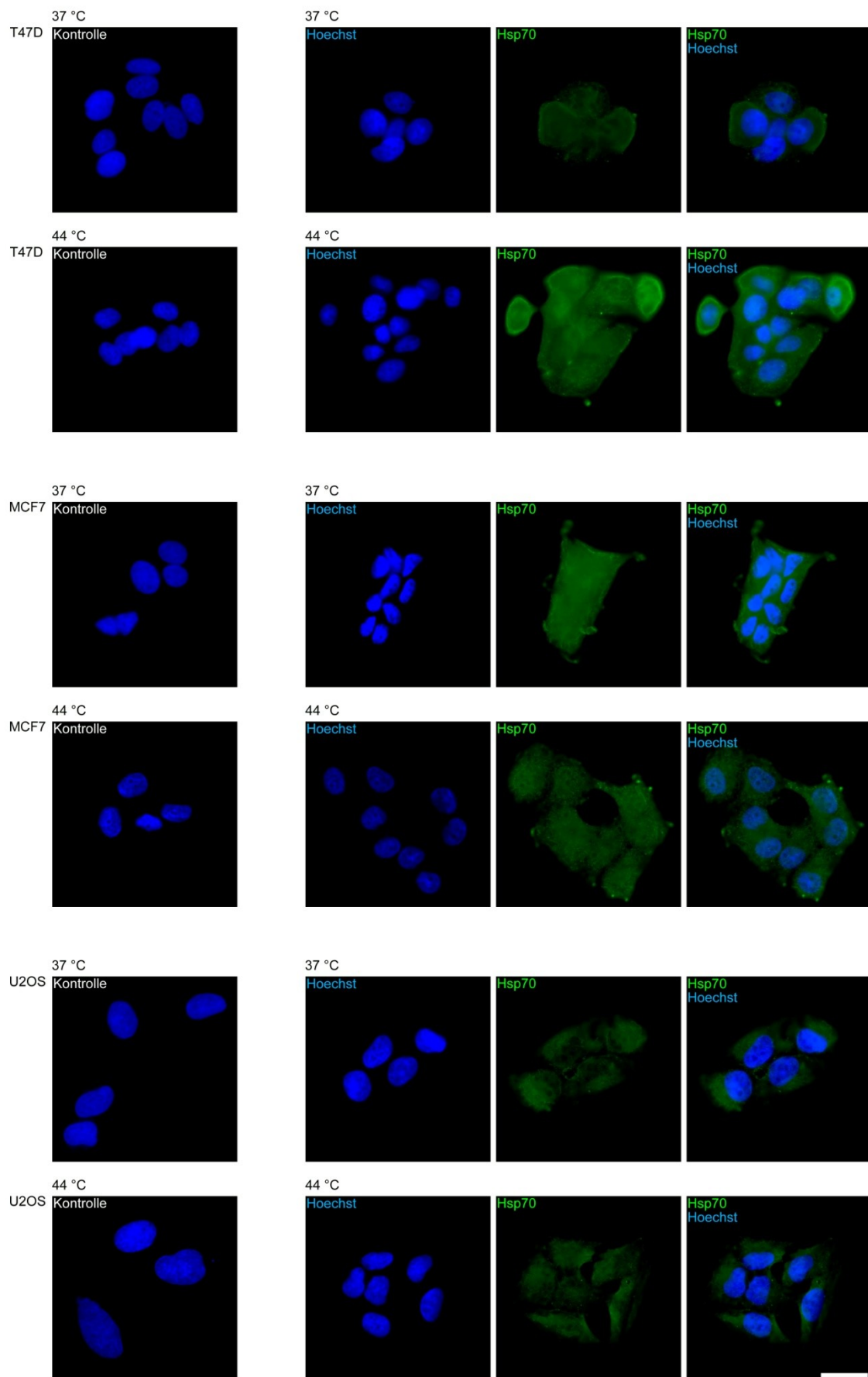


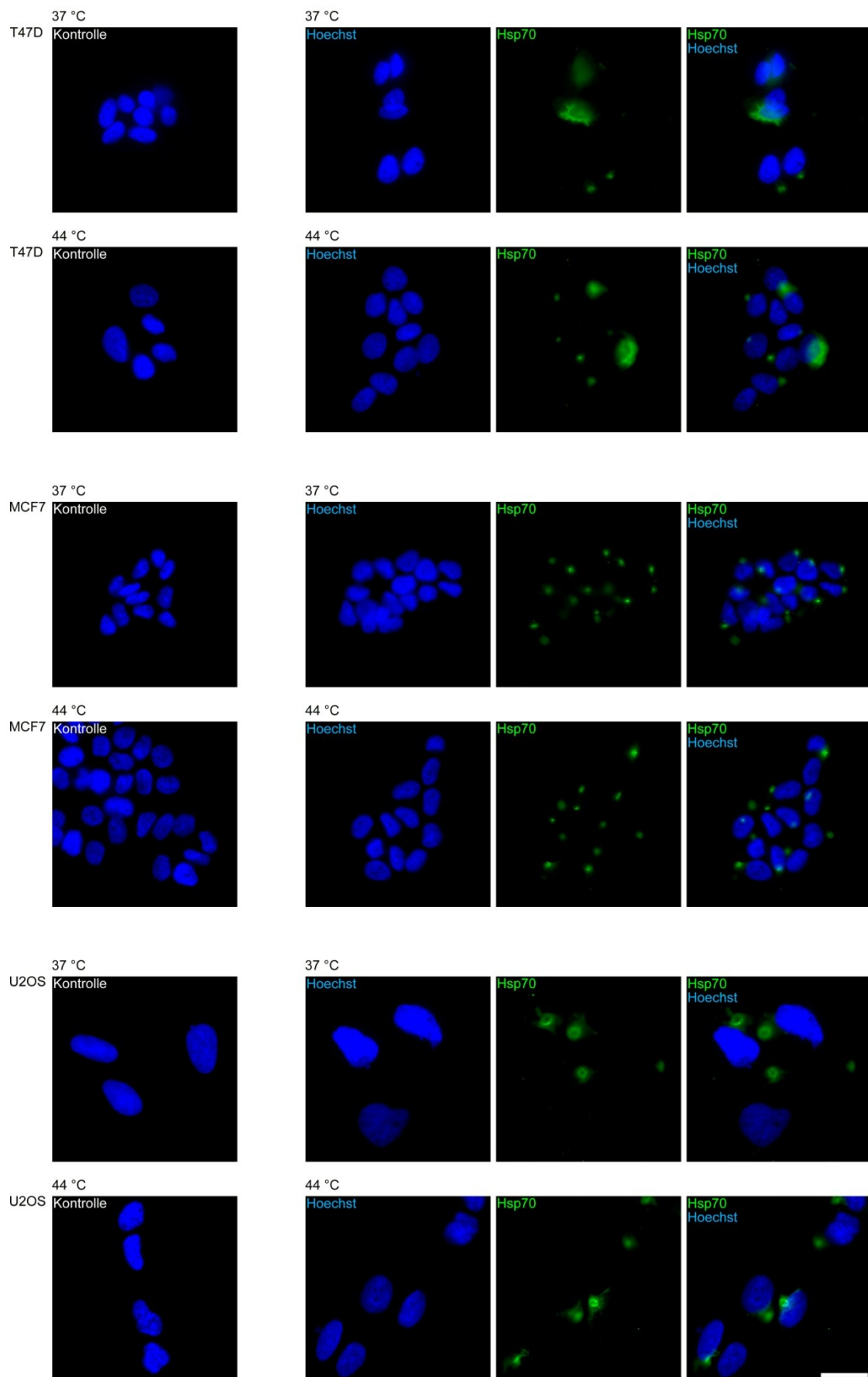
**Abbildung 9.4: Hsp70 und Hsp90 kolokalisieren auf den Oberflächen von MCF7-Zellen und akkumulieren in Clustern. T47D- und U2OS-Zellen benötigen nach der Aussaat bis zu 48 Stunden für die Bildung der Hsp70-Cluster.** MCF7- (A), T47D- (B) und U2OS-Zellen (C) wurden nach der Aussaat für 48 Stunden kultiviert und ohne Stressexposition (37 °C) sowie ohne Permeabilisierung für die Fluoreszenzmarkierung vorbereitet. Die Zielproteine Hsp70 (grün) und Hsp90 (rot) wurden indirekt immunfluoreszenzmarkiert, wobei für Hsp70 der polyklonale Primärantikörper sc-1060 und ein AlexaFluor647-gekoppelter Sekundärantikörper, für Hsp90 der monoklonale Primärantikörper ab1429 und ein AlexaFluor488-gekoppelter Sekundärantikörper zum Einsatz kamen. Die Markierung der DNS erfolgte mit Hoechst 33342 (blau). Z-Bilderstapel repräsentativer Zellen wurden mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops aufgenommen (Leica TCS SP2, 40-fach Ölimmersionsobjektiv). Aus diesen wurden Maximalprojektionen (MP) sowie 3D-Rekonstruktionen in gewinkelter und seitlicher Ansicht (3D) unter Nutzung des Oberflächenmodus (OM) oder einer Kombination von Überblendungs- und Oberflächenmodus (BM/OM) generiert. Im Falle der T47D- und U2OS-Zellen wurden zusätzlich horizontalen Querschnitte erstellt und rechteckige Bereiche der Hsp70-Kanäle entfernt, um die Absenz von Hoechst-Signalen innerhalb der an Vesikel erinnernden Hsp70-Cluster zu visualisieren. Alle Mikroskop- beziehungsweise Softwareeinstellungen wurden zunächst auf Präparate abgestimmt, für deren Herstellung keine Primärantikörper verwendet worden waren (Kontrolle) und im Anschluss für die mit Primär- und Sekundärantikörpern behandelten Präparate übernommen (Probe). Maßstab: 50 µm.

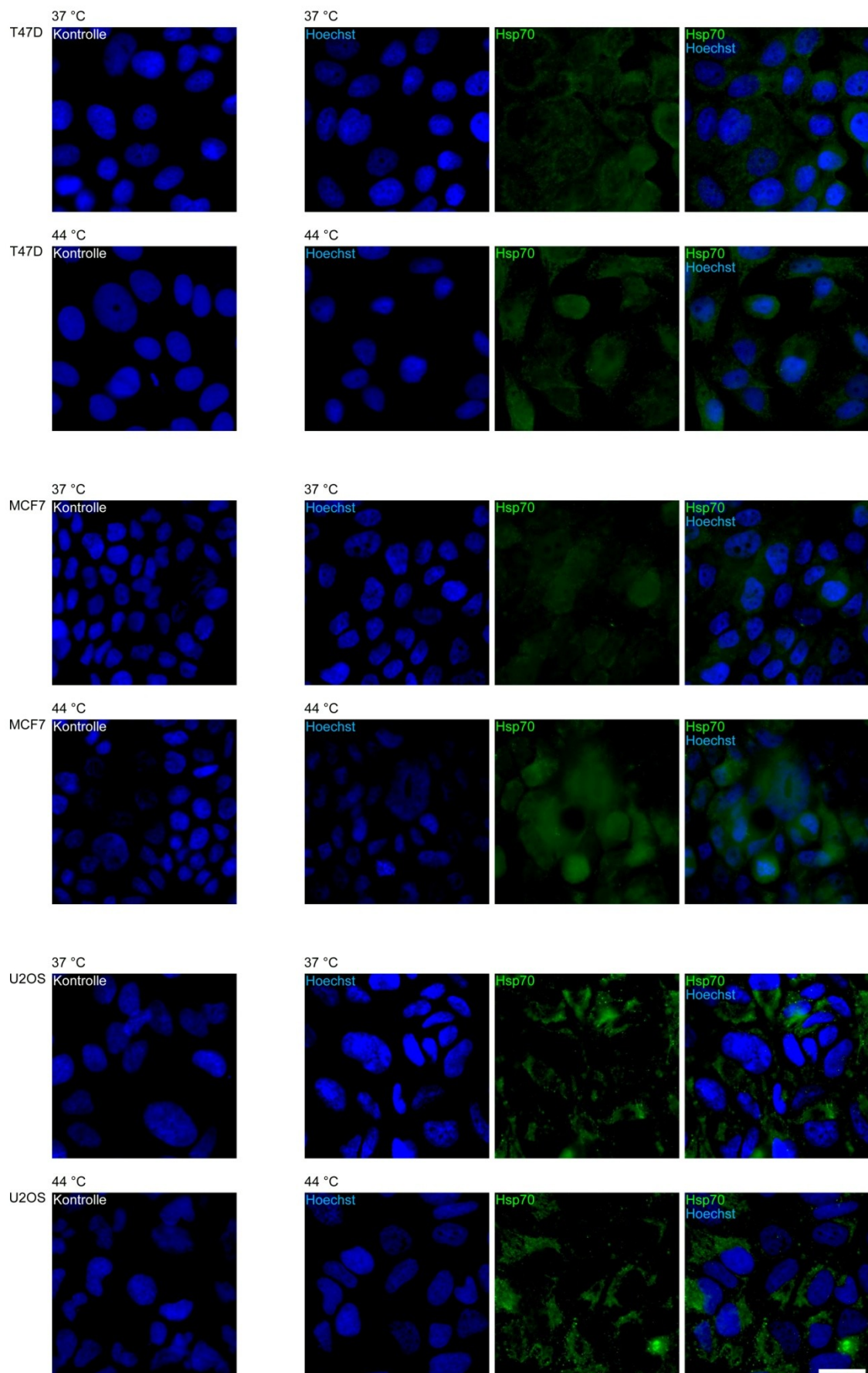


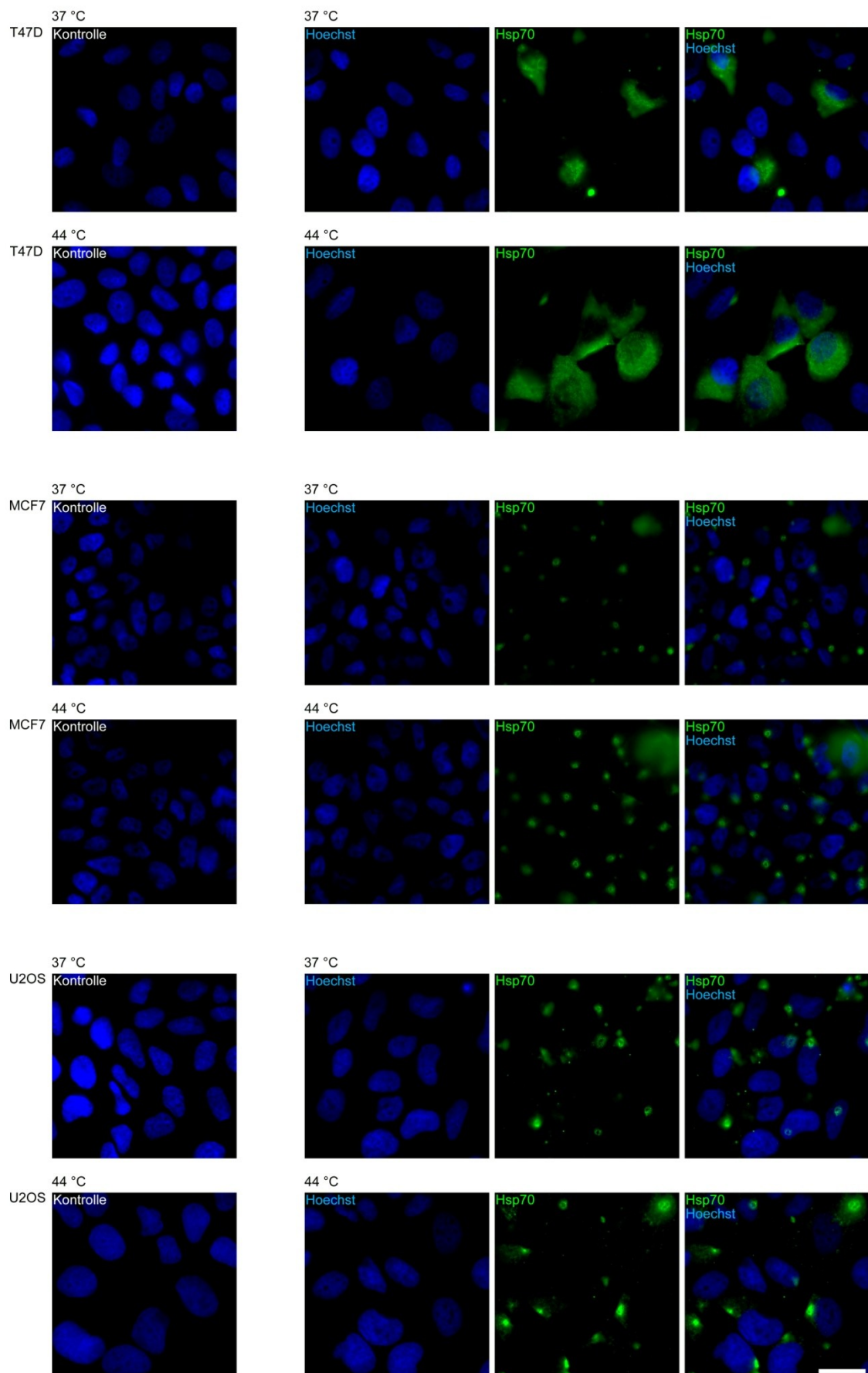


**Abbildung 9.5:** Die durch einen Hitzeschock induzierten Hsp70-Expressionssteigerungen lassen sich durch Quantifizierung der Signalintensitäten immunfluoreszenzmikroskopischer Bilder nicht erfassen. Ungestresste (37 °C) und gestresste (44 °C, 25 Minuten, acht Stunden Erholungszeit bei 37 °C) T47D- (A), MCF7- (B) und U2OS-Zellen (C) geringer ( $3,0 \times 10^4$  Zellen / Probe; g. Z.) und hoher Zelldichte ( $6,7 \times 10^5$  Zellen / Probe; h. Z.) wurden mit (+Triton) oder ohne Permeabilisierung (-Triton) für die Fluoreszenzmarkierung vorbereitet. Hsp70 wurde unter Nutzung des polyklonalen Primärantikörpers pAk sc-1060 indirekt Immunfluoreszenzmarkiert, die fertigen Präparate mittels eines inversen Fluoreszenzmikroskops analysiert (Leica DMI6000B, 63-fach Ölimmersionsobjektiv). Zur Quantifizierung der Fluoreszenzsignalintensitäten wurden innerhalb der resultierenden Einzelbilder entsprechende Bereiche von Interesse markiert und deren mittlere Graustufenwerte ermittelt. Die Säulendiagramme repräsentieren die sich aus der Zusammenfassung der einzelnen Werte mehrerer Bereiche jedes Probentyps ergebenden mittleren relativen Fluoreszenzsignalintensitäten (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen;  $n \geq 10$ ). Die hier dargestellten Quantifizierungsergebnissen umfassen alle Einzelbilder, die im Rahmen derselben immunfluoreszenzmikroskopischen Analyse aufgenommen wurden, welche auch den Abbildungen 4.8 beziehungsweise 9.6 zugrunde liegt.

**A** (+Triton)

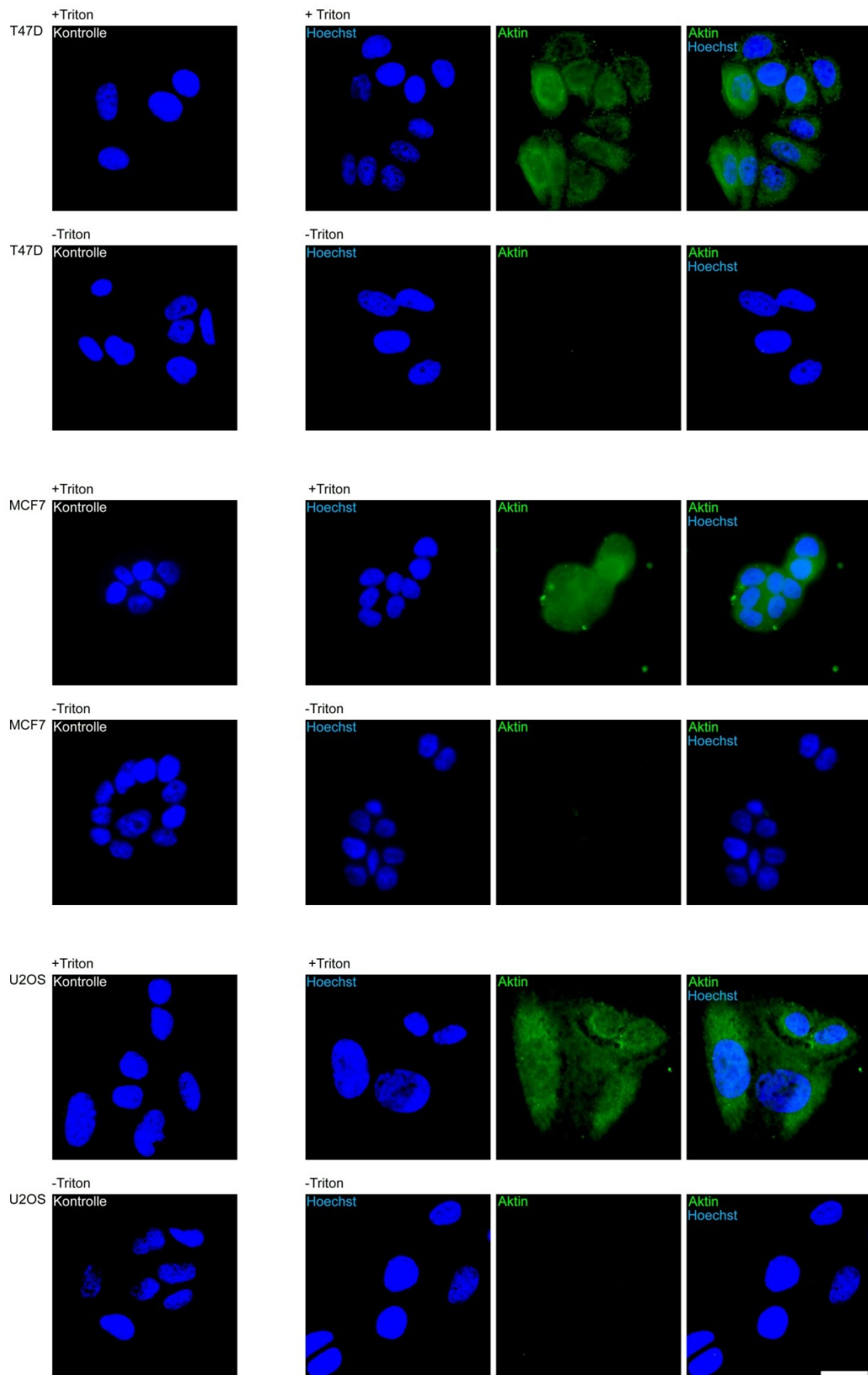
**B** (-Triton)

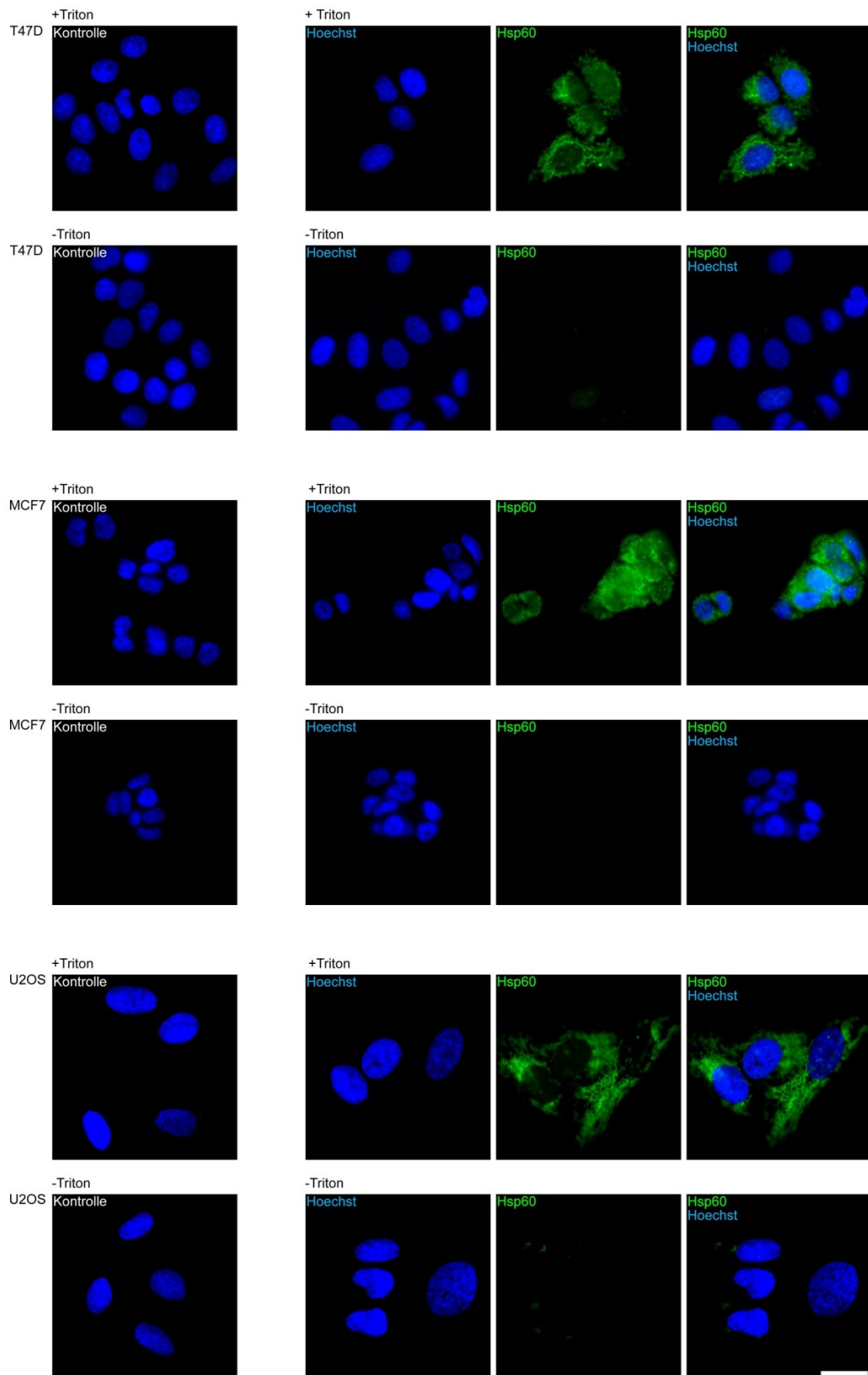
**C** (+Triton)

**D** (-Triton)

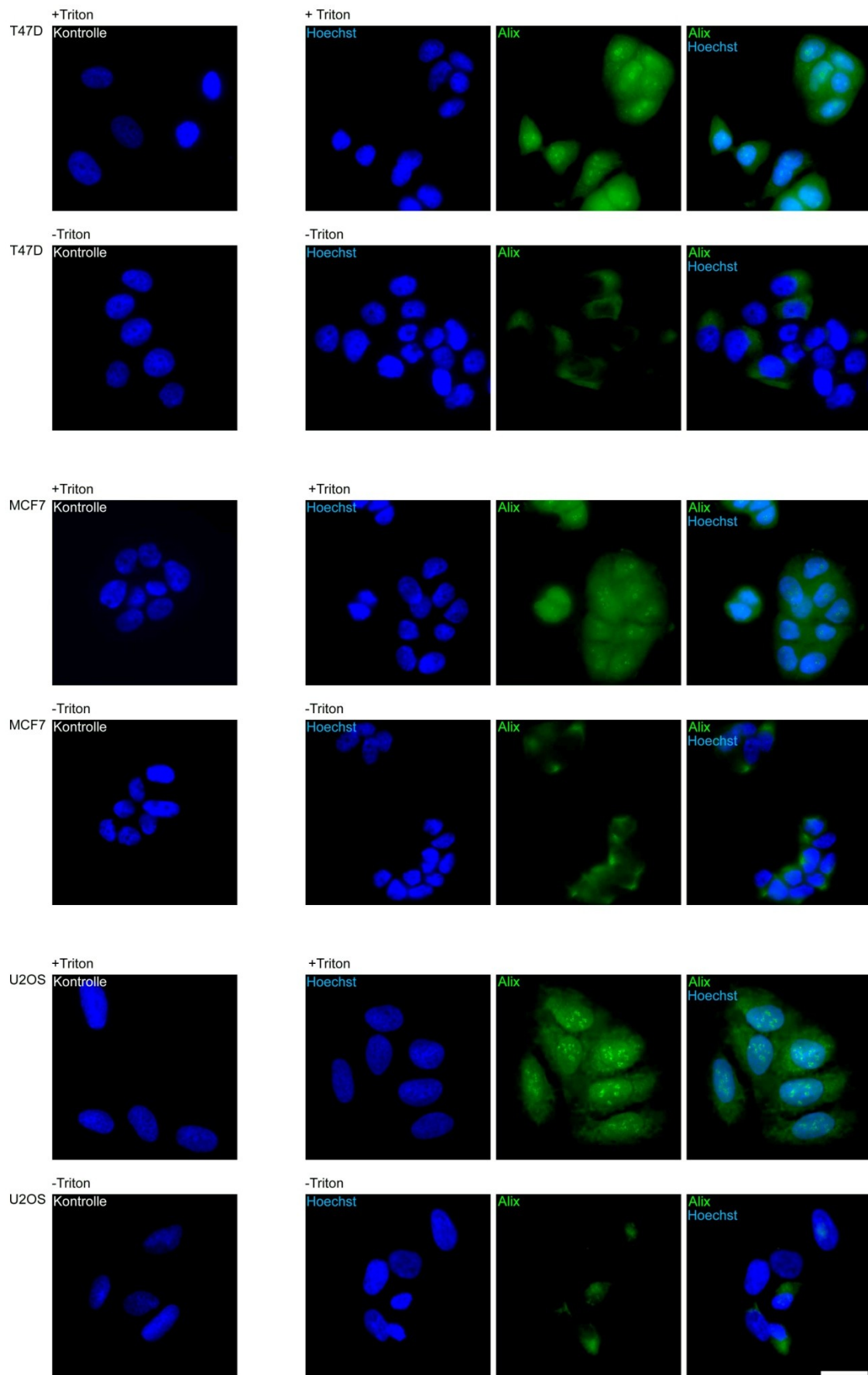
**Abbildung 9.6: Ergänzung zu Abbildung 4.8 "Die subzelluläre Lokalisation von Hsp70 wird bei T47D- sowie MCF7- und U2OS-Tumorzellen durch thermischen Stress nicht erkennbar beeinflusst".** Jeweils  $3,0 \times 10^4$  (A, B) oder  $6,7 \times 10^5$  (C, D) Zellen pro Probe beziehungsweise Deckgläschen wurden entweder durchgängig unter physiologischen Bedingungen kultiviert (37 °C) oder zunächst einem Hitzeschock ausgesetzt (44 °C, 25 Minuten) und für acht Stunden Erholungszeit bei 37 °C inkubiert. Danach wurden ungestresste und gestresste Zellen entweder mit (A, C; +Triton) oder ohne Permeabilisierung (B, D; -Triton) für die Fluoreszenzmarkierung vorbereitet. Hsp70 wurde unter Verwendung des polyklonalen Primärantikörpers sc-1060 sowie eines AlexaFluor647-gekoppelten Sekundärantikörpers indirekter immunfluoreszenzmarkiert, die DNS mit Hoechst 33342 gefärbt. Dargestellt sind die Einzelbilder der im Falle der eigentlichen Proben (Hoechst, Hsp70) jeweils für Hsp70 (grün) und DNS (blau) genutzten Detektionskanäle, sowie Überlagerungen der entsprechenden Einzelbilder von Proben (Hsp70 / Hoechst) und Negativkontrollen (Kontrolle), aufgenommen mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI6000B, 63-fach Ölimmersionsobjektiv). Alle Mikroskop- beziehungsweise Softwareeinstellungen wurden zur Darstellung der Zielproteine in den permeabilisierten, gestressten Zellen optimiert und im Anschluss ohne Änderungen für die entsprechenden unpermeabilisierten Präparate übernommen. Hierbei kamen die nachfolgend aufgeführten Einstellungen zur Anwendung: T47D: Signalverstärkung 1,0; Intensität 3,0; Belichtungszeit 200 Millisekunden. MCF7: Signalverstärkung 1,0; Intensität 4,0; Belichtungszeit 450 Millisekunden. U2OS: Signalverstärkung 1,0; Intensität 4,0; Belichtungszeit 200 Millisekunden. Maßstab: 25 µm.

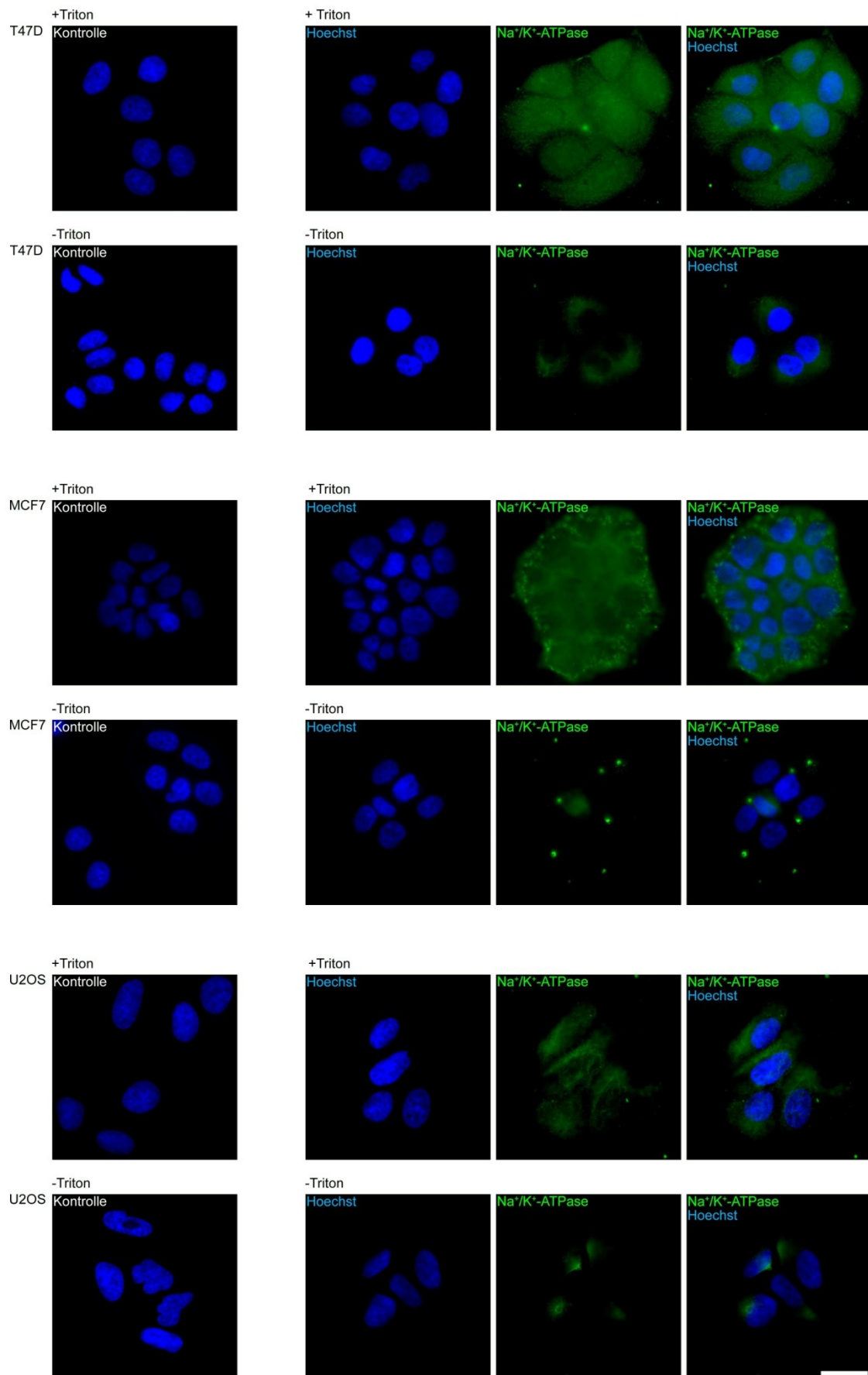


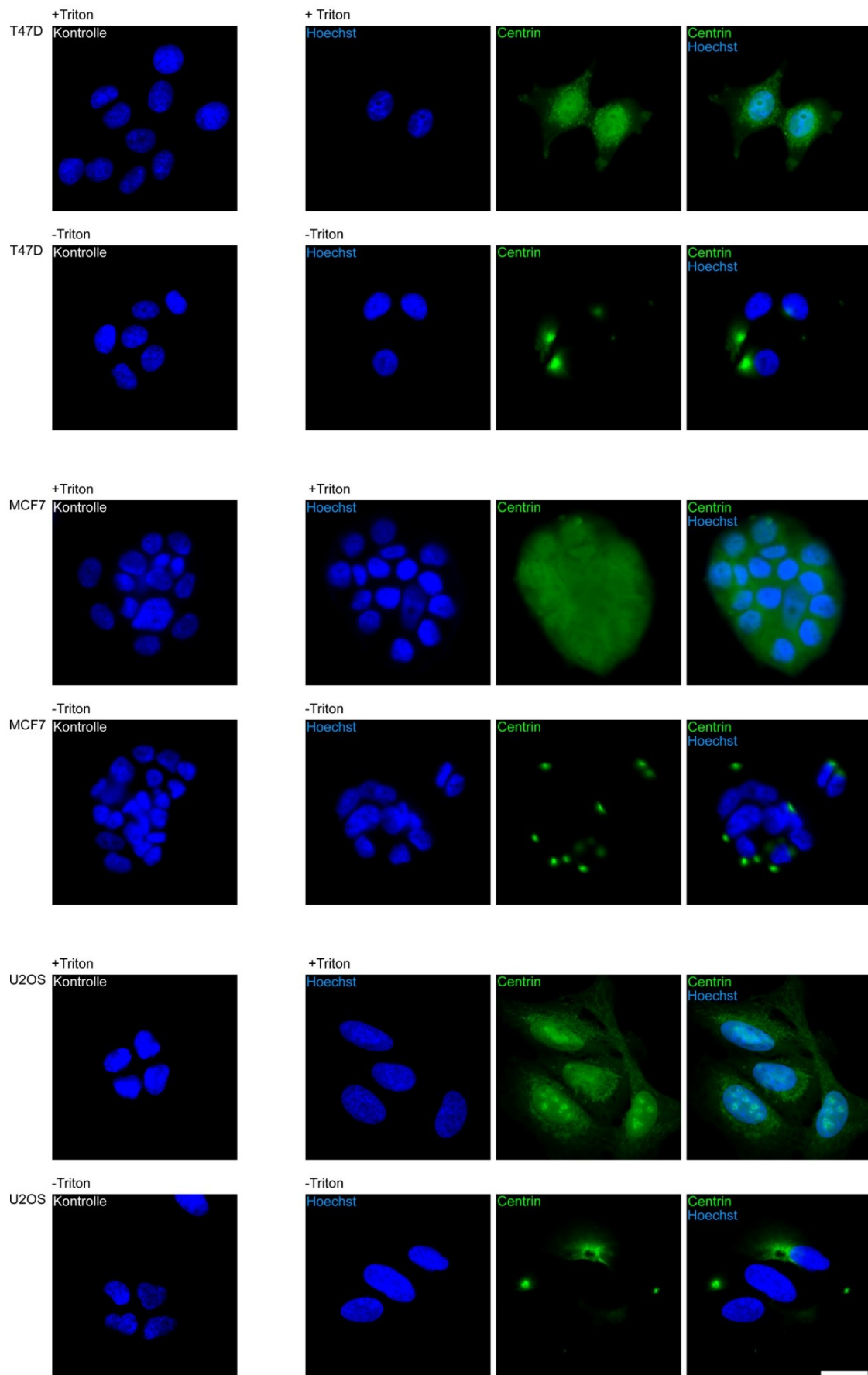
**A** (Aktin)

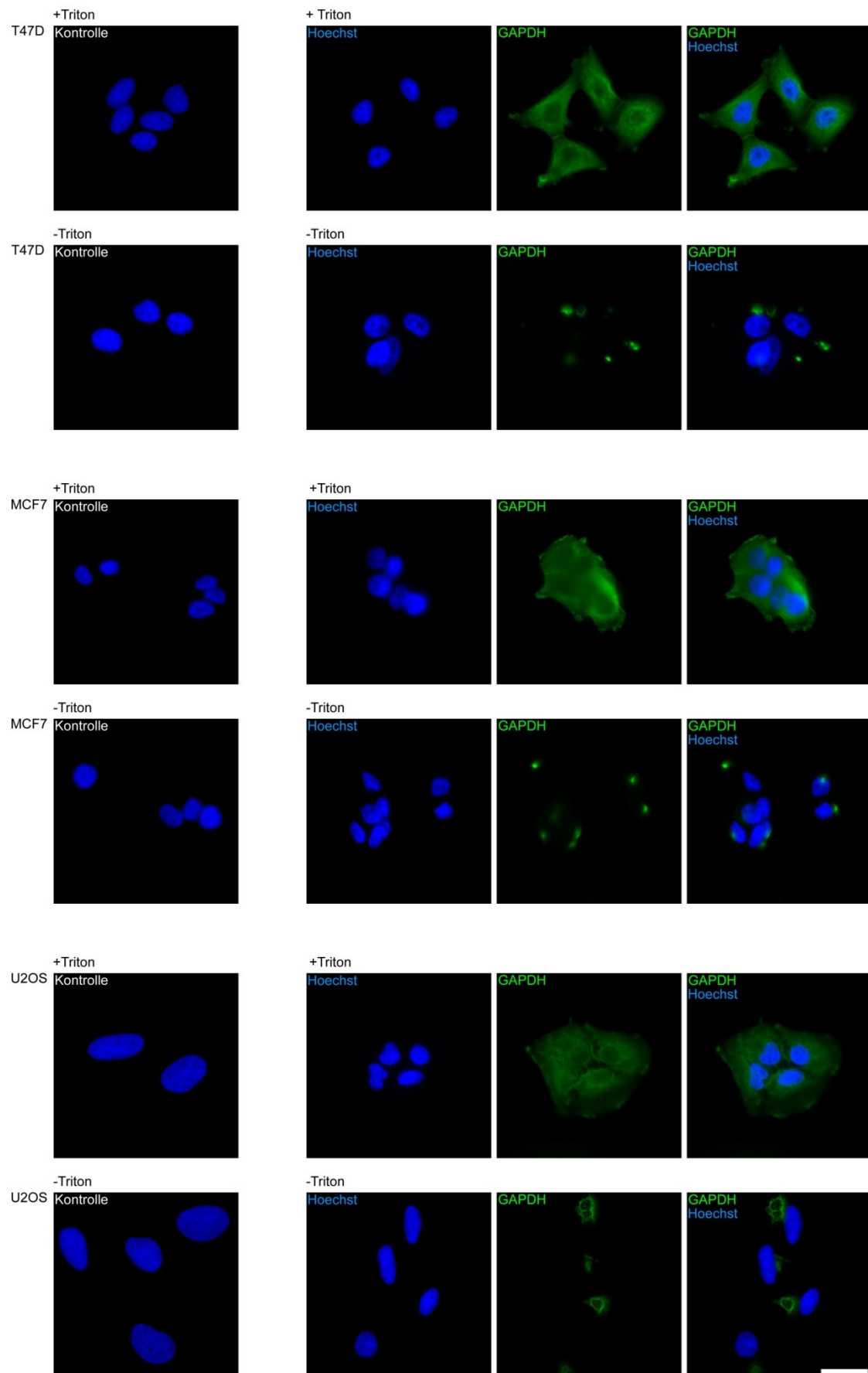
**B** (Hsp60)



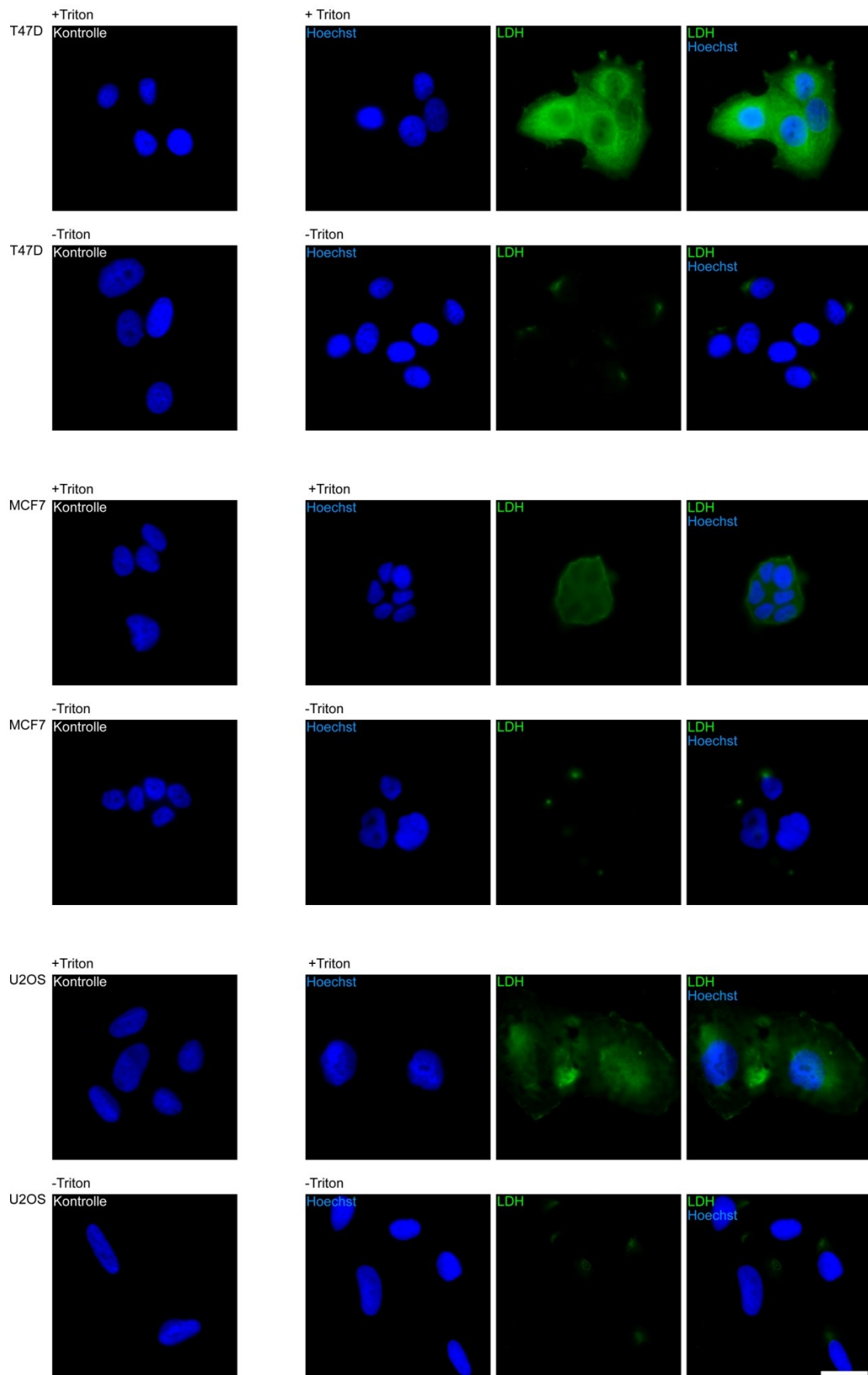
**C** (Alix)

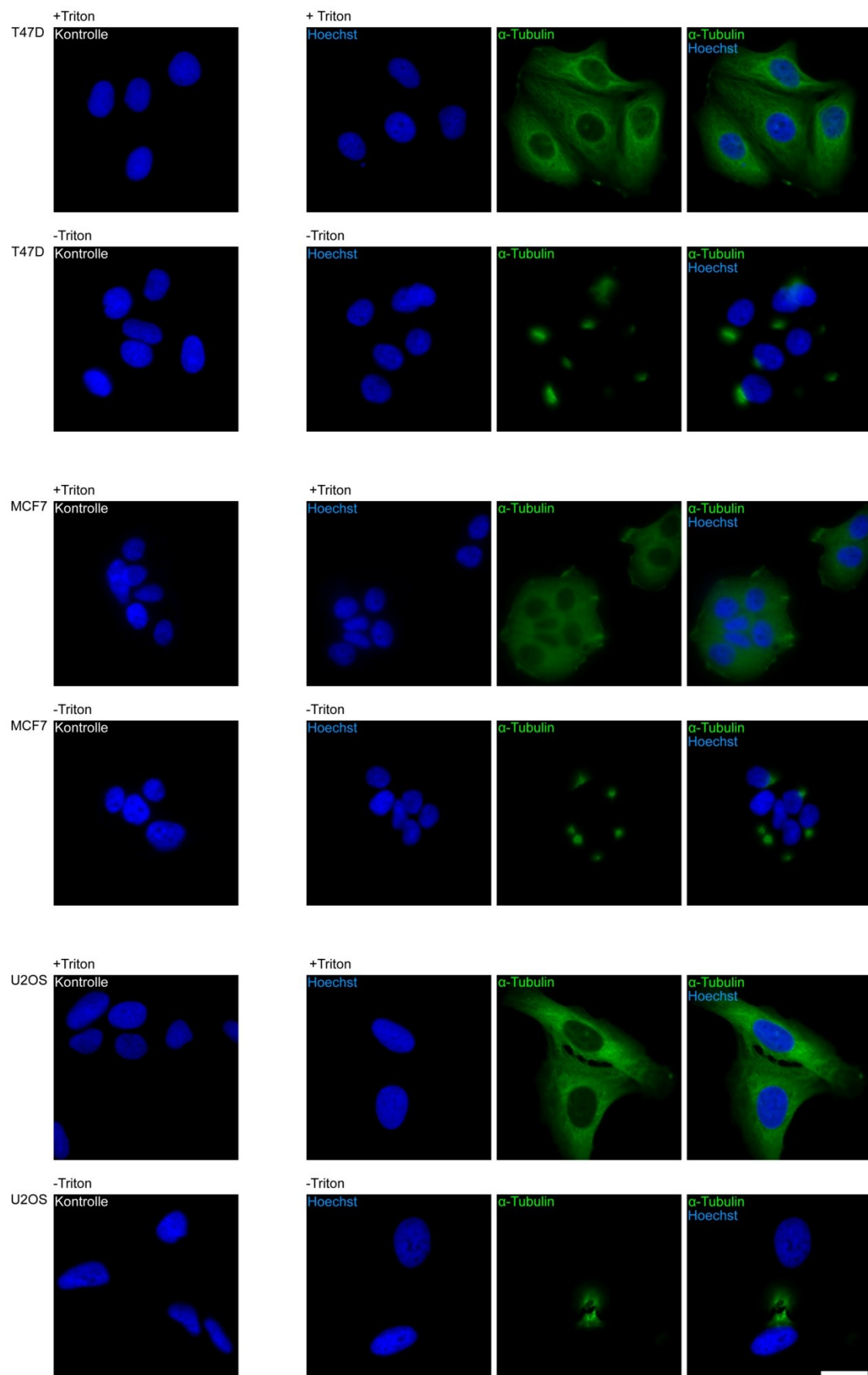
**D** (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase)

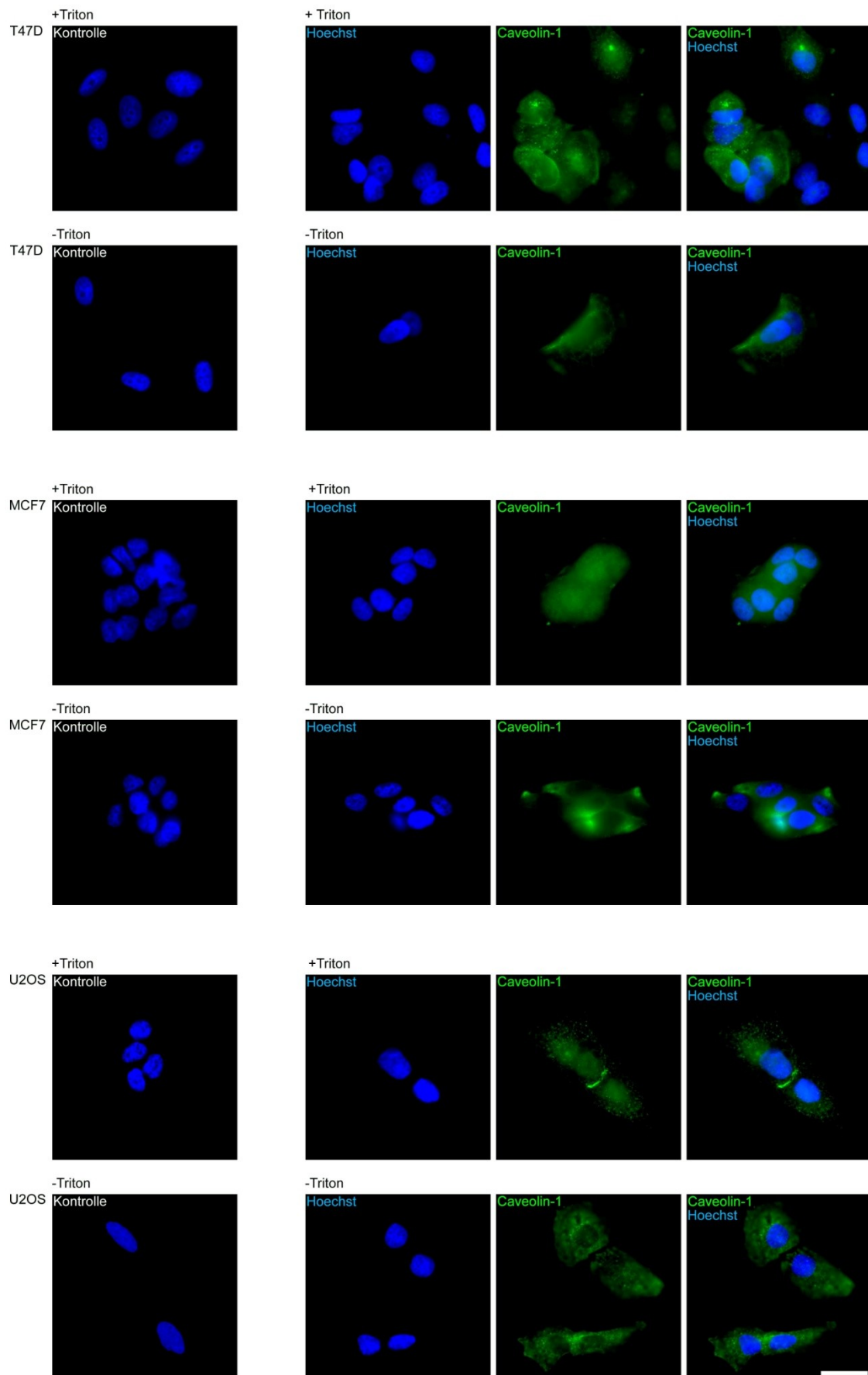
**E** (Centrin)

**F** (GAPDH)

# G (LDH)



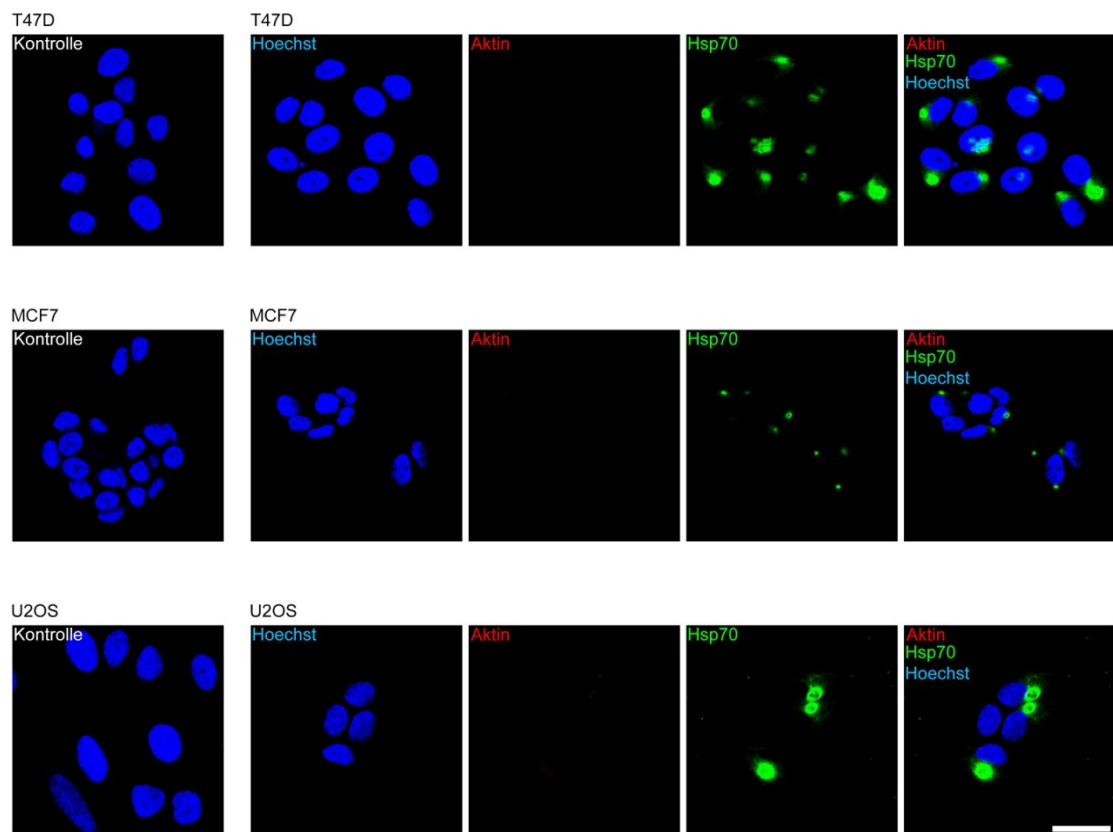
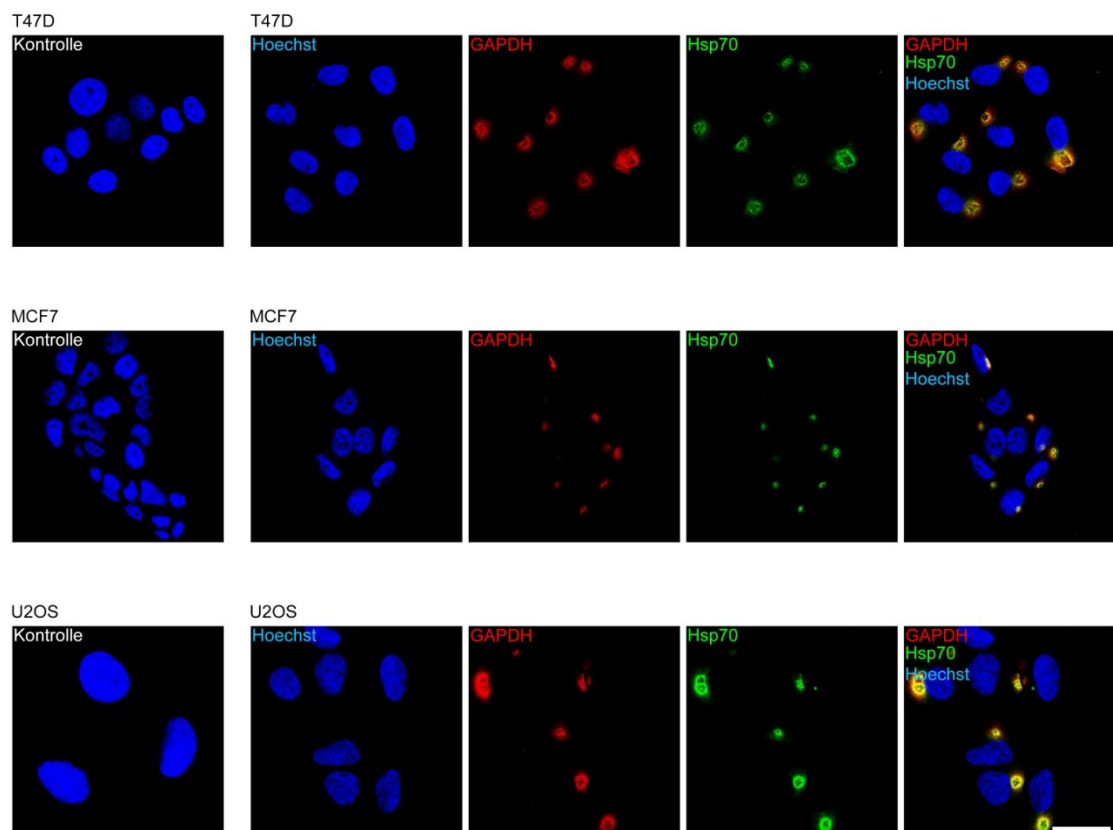
**H** ( $\alpha$ -Tubulin)

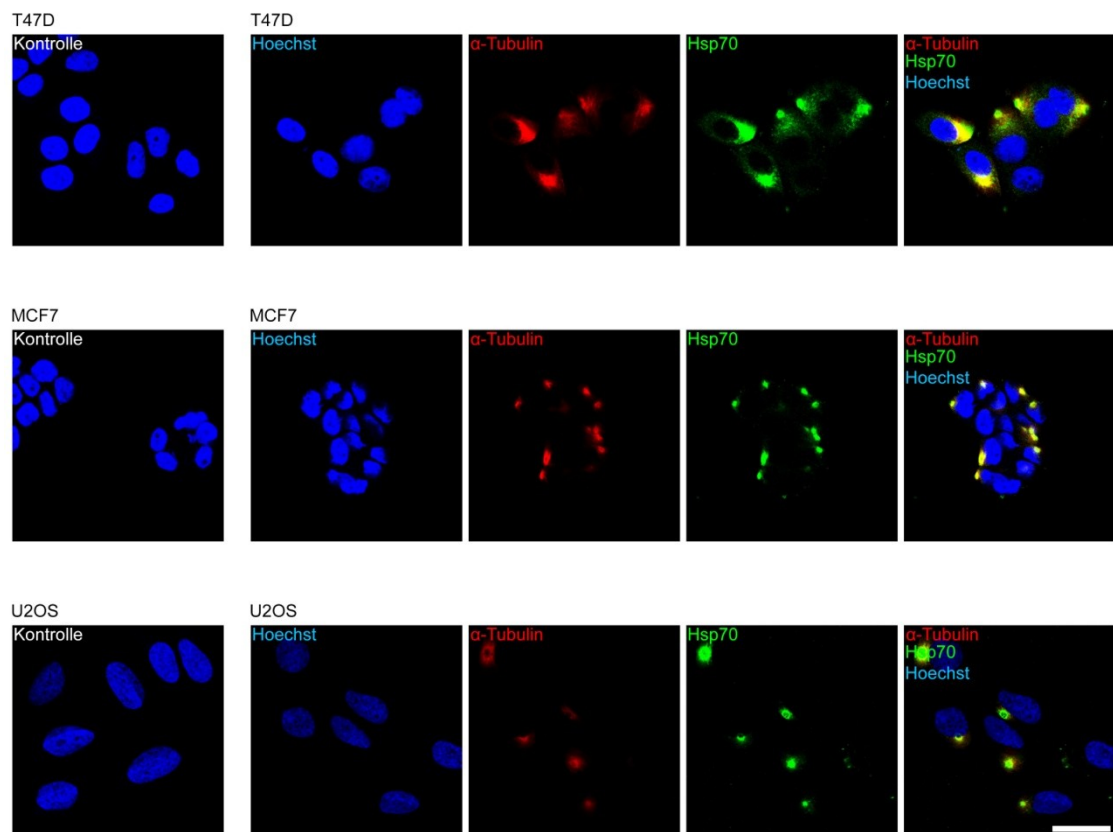
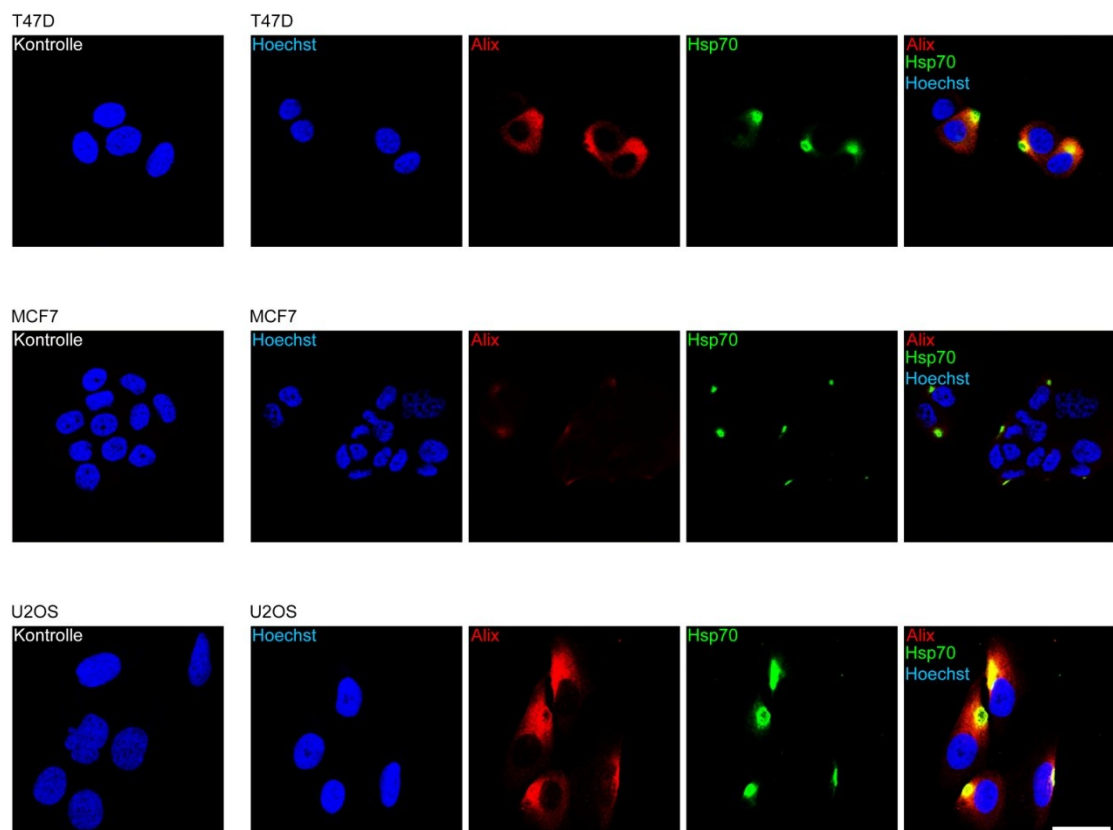
**I** (Caveolin-1)



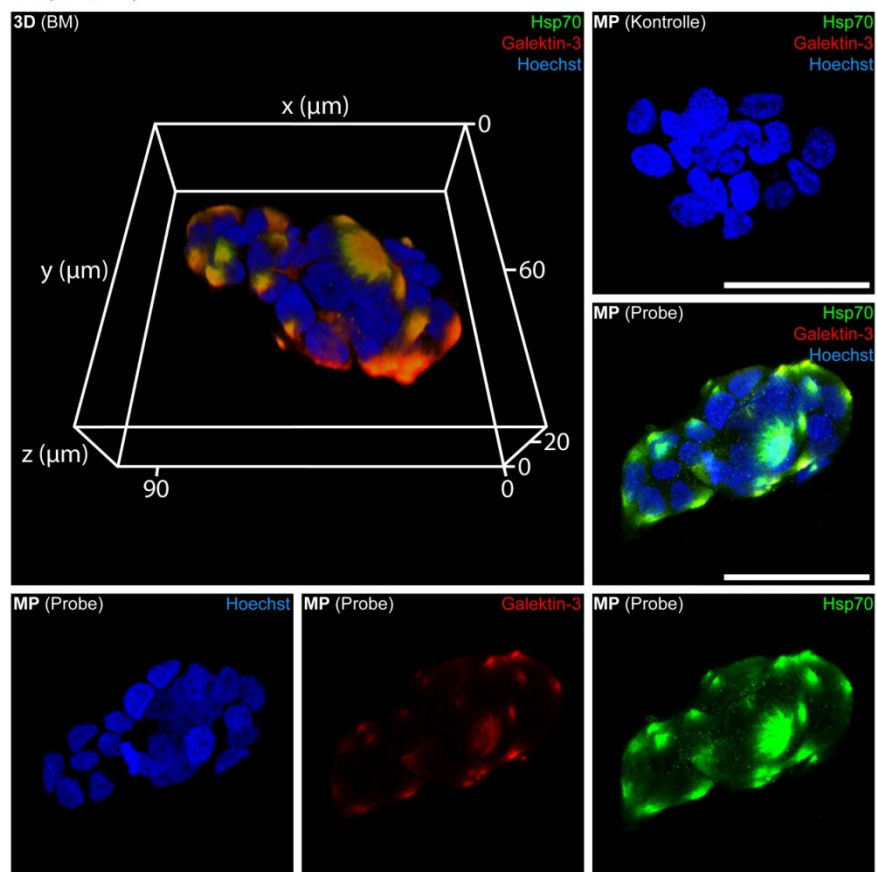
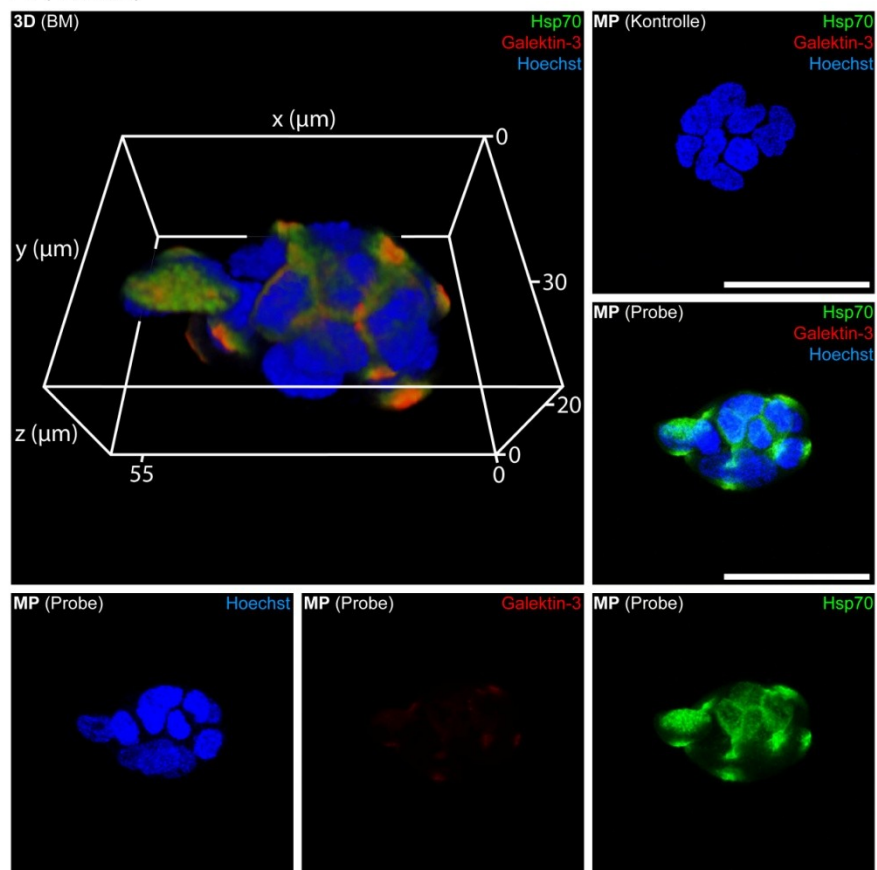
**Abbildung 9.7: Ergänzung zu Abbildung 4.9 "Auf der Oberfläche ungestresster Tumorzellen sind Alix sowie Caveolin-1 und die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasen meist weiträumiger als Hsp70 verteilt, Centrin, GAPDH sowie LDH und  $\alpha$ -Tubulin hingegen zeigen ein den Hsp70-Clustern entsprechendes Lokalisationsmuster".** Ungestresste T47D-, MCF7- und U2OS-Zellen wurden mit (+Triton) oder ohne Permeabilisierung (-Triton) für die Fluoreszenzmarkierung vorbereitet. Die Zielproteine wurden unter Verwendung folgender Kombinationen aus monoklonalen (mAk) beziehungsweise polyklonalen Primärantikörpern (pAk) und entsprechend spezifischen, Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern indirekt immunfluoreszenzmarkiert: **(A)** Aktin: mAk Ab-5, AlexaFluor546; **(B)** Hsp60: mAk ab13532, AlexaFluor647; **(C)** Alix: pAk sc99010, AlexaFluor546; **(D)** Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: mAk sc-48345, AlexaFluor546; **(E)** Centrin: pAk C7736, AlexaFluor546; **(F)** GAPDH: mAk 1D4, AlexaFluor546; **(G)** LDH: pAk ab7639, AlexaFluor647; **(H)**  $\alpha$ -Tubulin: mAk sc-53029, AlexaFluor546; **(I)** Caveolin-1: mAk D46G3, AlexaFluor546. Die DNS wurde mit Hoechst 33342 gefärbt. Die Analyse der fertigen Präparate erfolgte mittels eines inversen Fluoreszenzmikroskops (Leica DMI6000B, 63-fach Ölimmersionsobjektiv). Dargestellt sind die Einzelbilder der im Falle der eigentlichen Proben jeweils für Zielprotein (grün) und DNS (blau) genutzten Detektionskanäle, sowie Überlagerungen der Einzelbilder der Proben (Zielprotein / Hoechst) und der Negativkontrollen (Kontrolle). Alle Mikroskop- beziehungsweise Softwareeinstellungen wurden zunächst zur Darstellung des jeweiligen Zielproteins in den permeabilisierten Zellen optimiert, falls erforderlich auf die entsprechende Negativkontrolle abgestimmt und im Anschluss ohne jedwede Änderungen für die Analyse der entsprechenden unpermeabilisierten Präparate übernommen. Maßstab: 25  $\mu$ m.



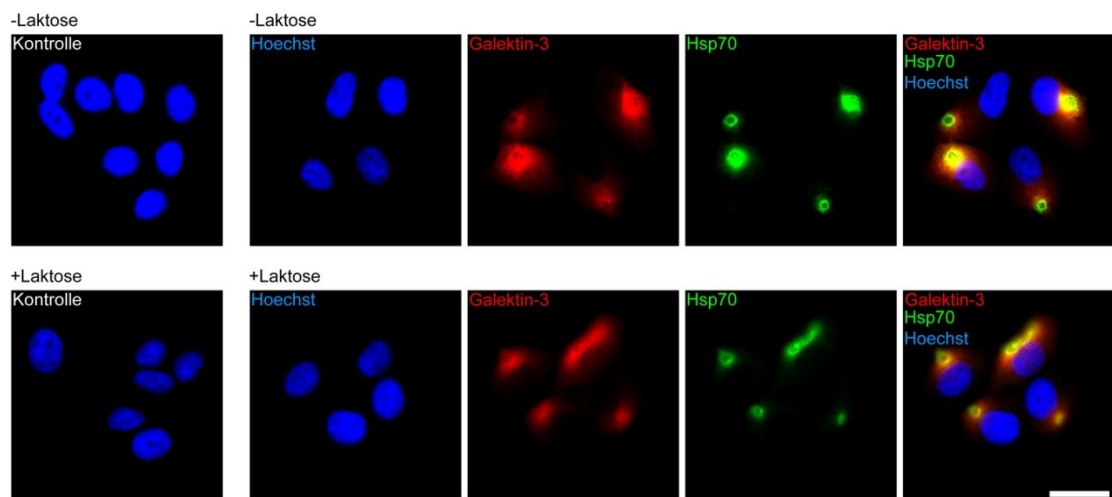
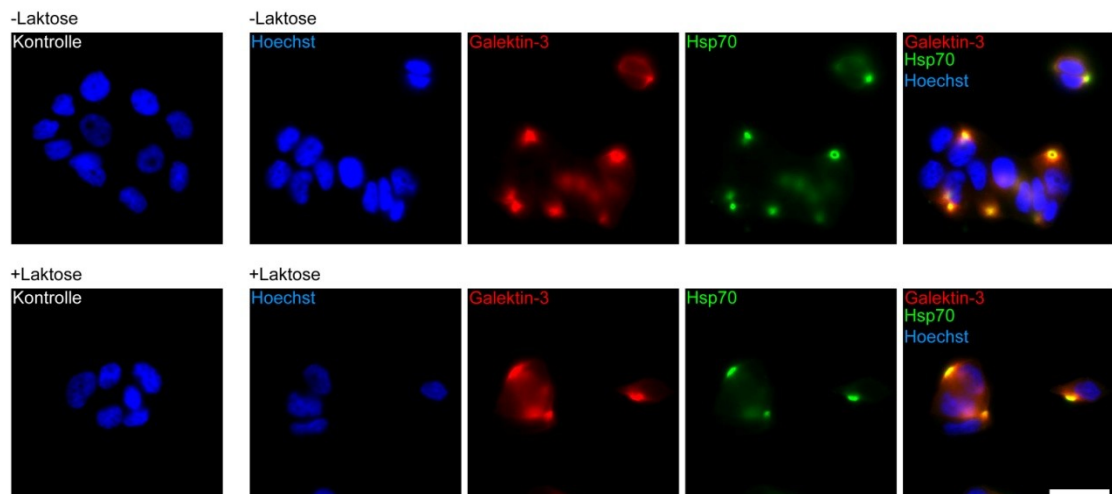
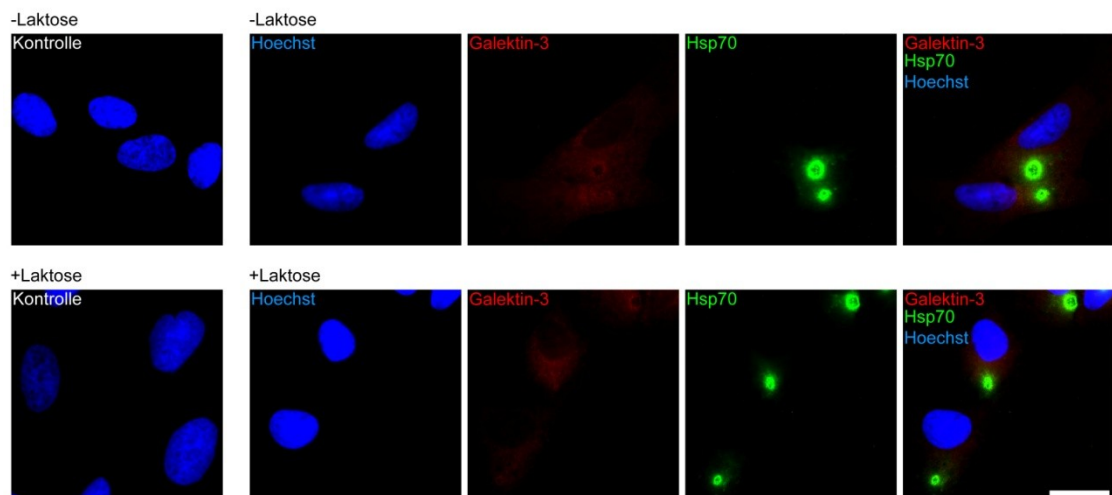
**A** (Aktin, Hsp70)**B** (GAPDH, Hsp70)

**C** ( $\alpha$ -Tubulin, Hsp70)**D** (Alix, Hsp70)

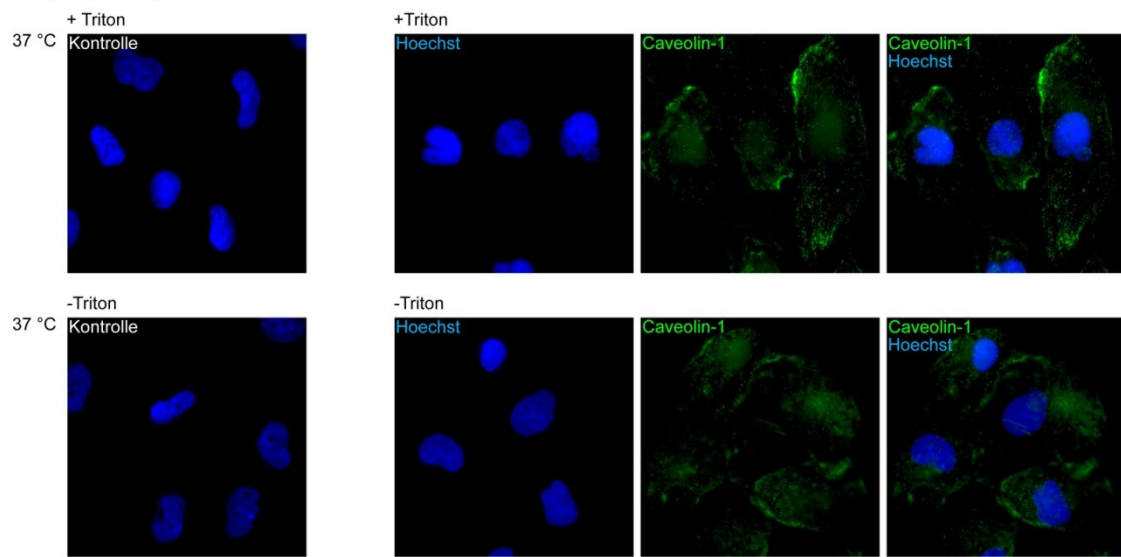
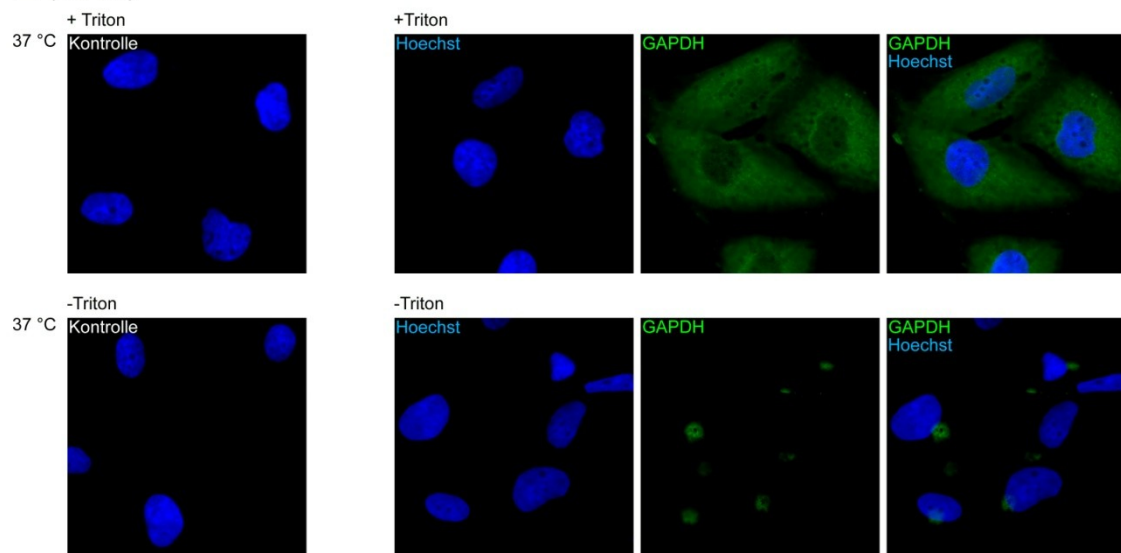
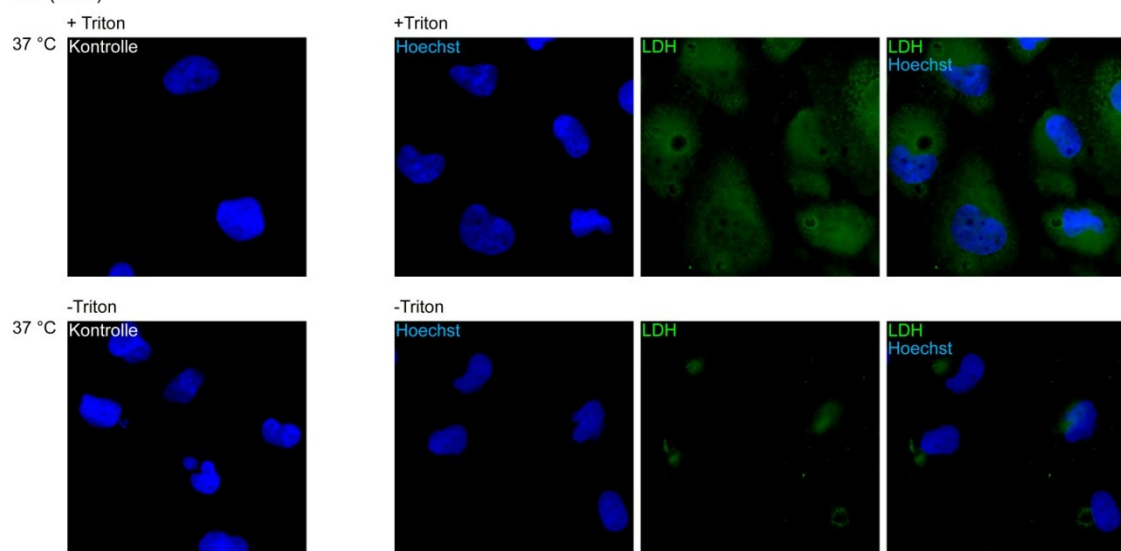
**Abbildung 9.8: Ergänzung zu Abbildung 4.10 "Auf den Oberflächen ungestresster Tumorzellen kolo-kalisieren GAPDH,  $\alpha$ -Tubulin und Alix mit Hsp70".** Ungestresste T47D, MCF7- und U2OS-Zellen wurden ohne Permeabilisierung für die Fluoreszenzmarkierung vorbereitet und jeweils zwei Zielproteine mit polyklonalen (pAk) beziehungsweise monoklonalen Primärantikörpern (mAk) sowie Fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpern in folgenden Kombinationen parallel indirekt immunfluoreszenzmarkiert: **(A)** Hsp70 (pAk sc-1060, AlexaFluor647) und Aktin (mAk Ab-5, AlexaFluor546), **(B)** Hsp70 (pAk sc-1060, AlexaFluor647) und GAPDH (mAk 1D4, AlexaFluor546), **(C)** Hsp70 (pAk sc-1060, AlexaFluor488) und  $\alpha$ -Tubulin (mAk sc-53029, AlexaFluor646), **(D)** Hsp70 (pAk sc-1060, AlexaFluor647) und Alix (pAk sc99010, AlexaFluor488). Die DNS wurde mit Hoechst 33342 gefärbt. Die Analyse der fertigen Proben erfolgte mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (Leica TCS SP2, 40-fach Ölimmersionsoberktiv). Dargestellt sind die Einzelbilder der im Falle der eigentlichen Proben jeweils für Hsp70 (grün), das zweite Zielprotein (rot) und die DNS (blau) genutzten Detektionskanäle, sowie Überlagerungen der Einzelbilder von Proben (Zielprotein zwei / Hsp70 / Hoechst) und Negativkontrollen (Kontrolle). Maßstab: 50  $\mu$ m

**A** (-Laktose)**B** (+Laktose)

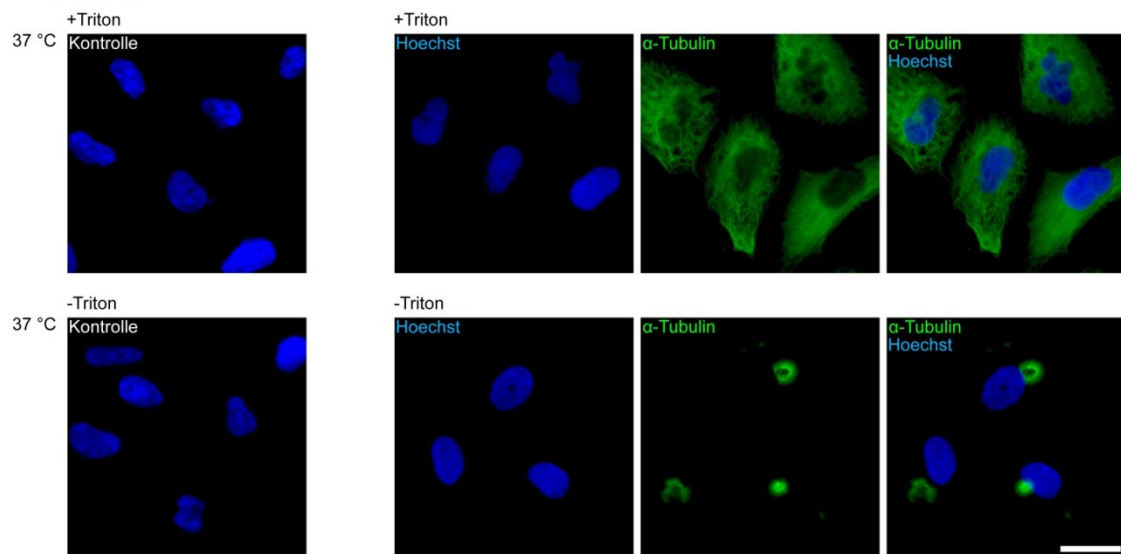
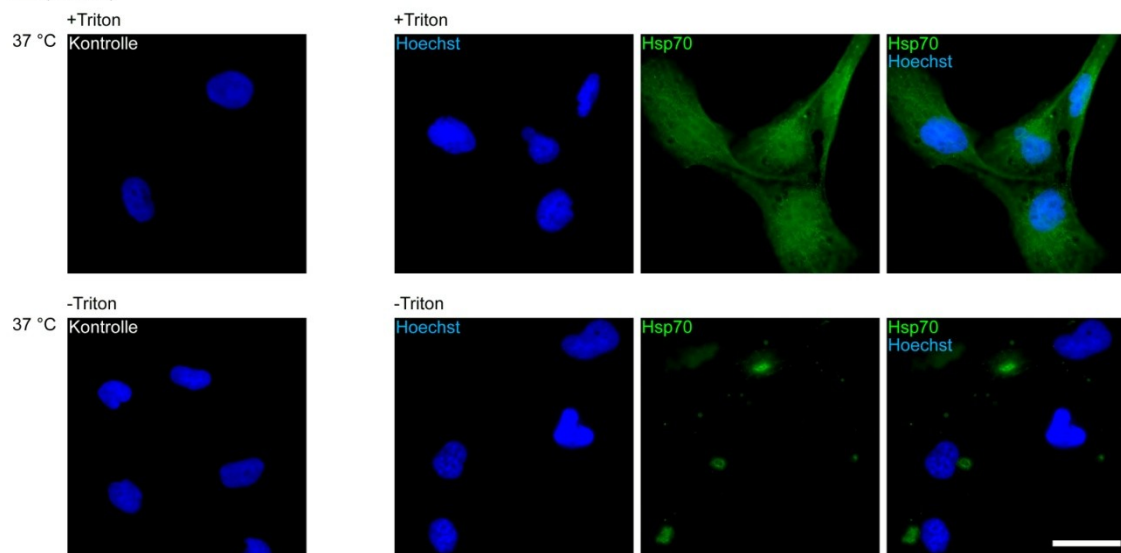
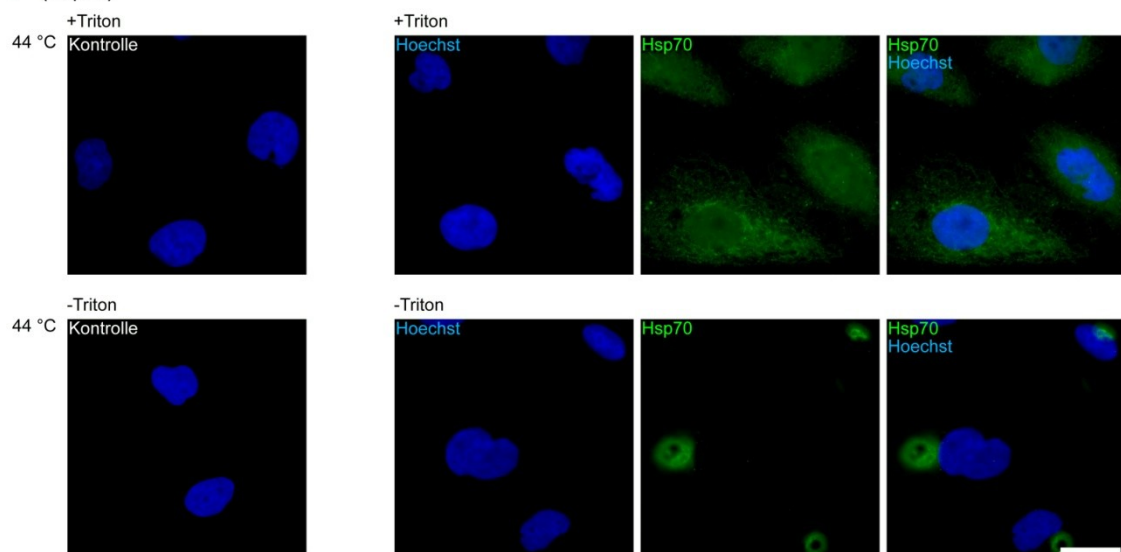
**Abbildung 9.9: Hsp70 und Galektin-3 kolokalisieren auf den Oberflächen von MCF7-Zellen und akkumulieren in Clustern.** Ungestresste MCF7-Zellen wurden 48 Stunden nach der Aussaat zunächst mit 150-millimolarer Laktose-Lösung vorbehandelt (+Laktose; 4,0 °C, 45 Minuten) und danach zusammen mit unbehandelten Zellen (-Laktose) jeweils ohne Permeabilisierung für die Fluoreszenzmarkierung vorbereitet. Das Zielprotein Hsp70 (grün) wurde mit dem monoklonalen Primärantikörper sc-59569 und einem AlexaFluor546-gekoppelten Sekundärantikörper, Galektin-3 (rot) mit dem monoklonalen Primärantikörper sc-23938 und einem AlexaFluor647-gekoppelten Sekundärantikörper parallel indirekt immunfluoreszenzmarkiert. Die DNS wurde mit Hoechst 33342 gefärbt. Z-Bilderstapel repräsentativer Zellen wurden mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops aufgenommen (Leica TCS SP2, 40-fach Ölimmersionsobjektiv). Hierbei wurden alle Mikroskop- beziehungsweise Softwareeinstellungen zunächst zur Darstellung der Zielproteine auf den nicht mit Laktose vorbehandelten Zellen optimiert (Probe). Nach Abstimmung auf Präparate, für deren Herstellung keine Primärantikörper verwendet worden waren (Kontrolle), wurden diese Einstellungen für die mit Laktose sowie mit Primär- und Sekundärantikörper behandelten Präparate übernommen (Probe). Aus den Bildstapeln wurden Maximalprojektionen sowie 3D-Rekonstruktionen generiert, wobei für Letztere eine Kombination von Maximal- und Überblendungsmodus (BM) zum Einsatz kam. Dargestellt sind neben den 3D-Rekonstruktionen (3D) auch Maximalprojektionen (MP) der Bildstapel der für Hsp70 sowie Galektin-3 genutzten Detektionskanäle, sowie Überlagerungen beider Bildstapel mit dem jeweils zugehörigen Bildstapel des für die DNS genutzten Detektionskanals (blau). Maßstab: 50 µm.

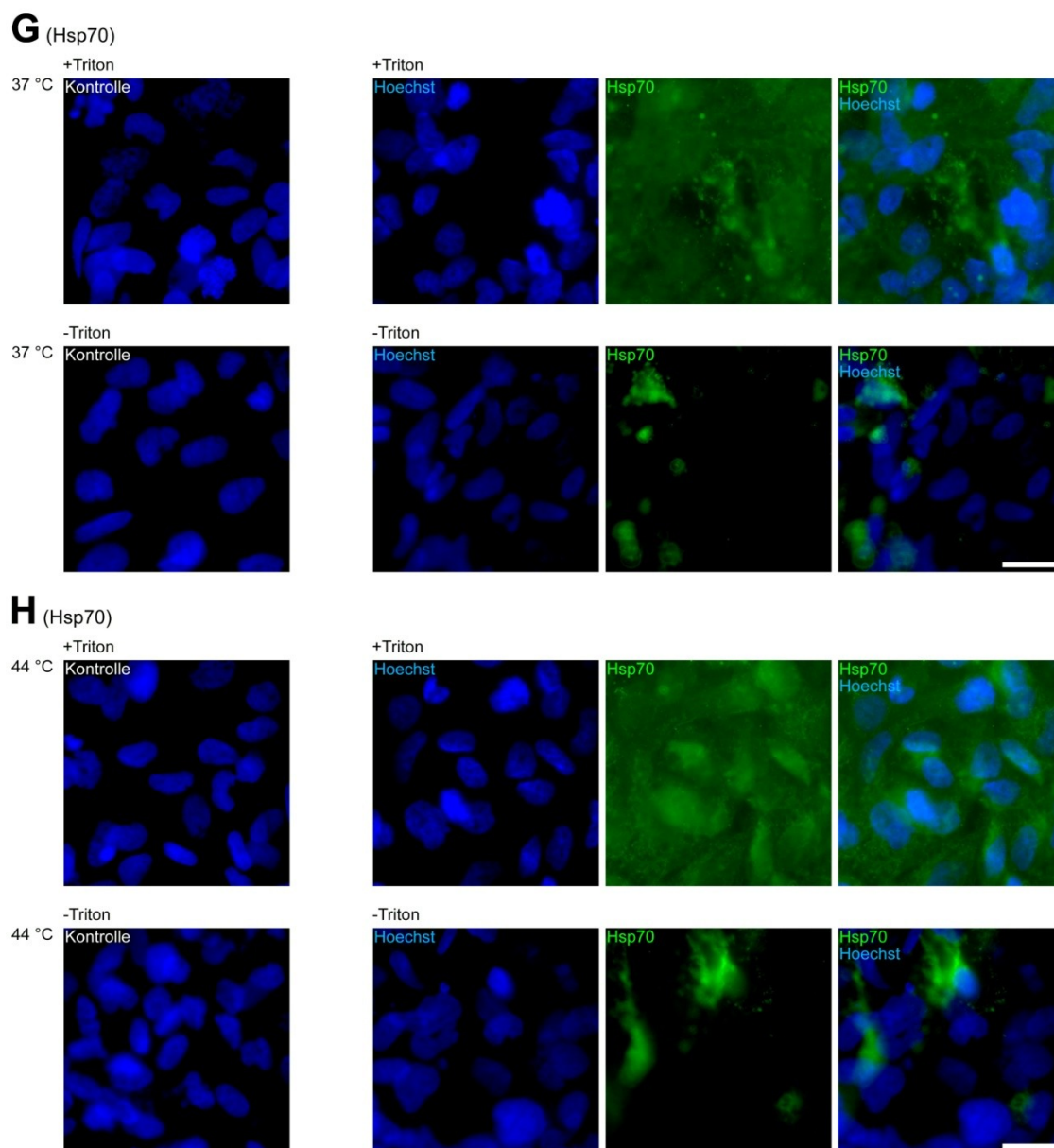
**A** (T47D)**B** (MCF7)**C** (U2OS)

**Abbildung 9.10: Ergänzung zu Abbildung 4.12 "Galektin-3 ist auf Oberfläche von Mammakarzinom-Zellen nur geringfügig weiträumiger verteilt als Hsp70, kolokalisiert mit diesem in eng begrenzten Bereichen und lässt sich durch Laktose nicht entfernen".** Ungestresste T47D- (A), MCF7- (B) und U2OS-Zellen (C) wurden 72 Stunden nach der Aussaat zunächst mit 150-millimolarer Laktose-Lösung vorbehandelt (+Laktose; 4,0 °C, 45 Minuten) und danach zusammen mit unbehandelten Zellen (-Laktose) ohne Permeabilisierung für die Fluoreszenzmarkierung vorbereitet. Das Zielprotein Hsp70 wurde mittels des polyklonalen Primärantikörpers sc-1060 sowie eines AlexaFluor488-gekoppelten Sekundärantikörpers, Galektin-3 mittels des monoklonalen Primärantikörpers sc-23938 und eines AlexaFluor647-gekoppelten Sekundärantikörpers indirekt immunfluoreszenzmarkiert. Die Markierung der DNS erfolgte mit Hoechst 33342. Dargestellt sind Einzelbilder der für Hsp70 (grün) sowie Galektin-3 (rot) genutzten Detektionskanäle, sowie Überlagerungen beider Bilder mit dem jeweils zugehörigen Einzelbild des für die DNS genutzten Detektionskanals (blau), sowie entsprechende Überlagerungen der Negativkontrollen (Kontrolle), aufgenommen mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI6000B, 63-fach Ölimmersionsobjektiv). Alle Mikroskop- beziehungsweise Softwareeinstellungen wurden zunächst zur Darstellung der Zielproteine auf den nicht mit Laktose vorbehandelten Zellen optimiert, falls erforderlich auf die entsprechenden Negativkontrollen abgestimmt und im Anschluss für die vorbehandelten Präparate übernommen. Maßstab: 25 µm.

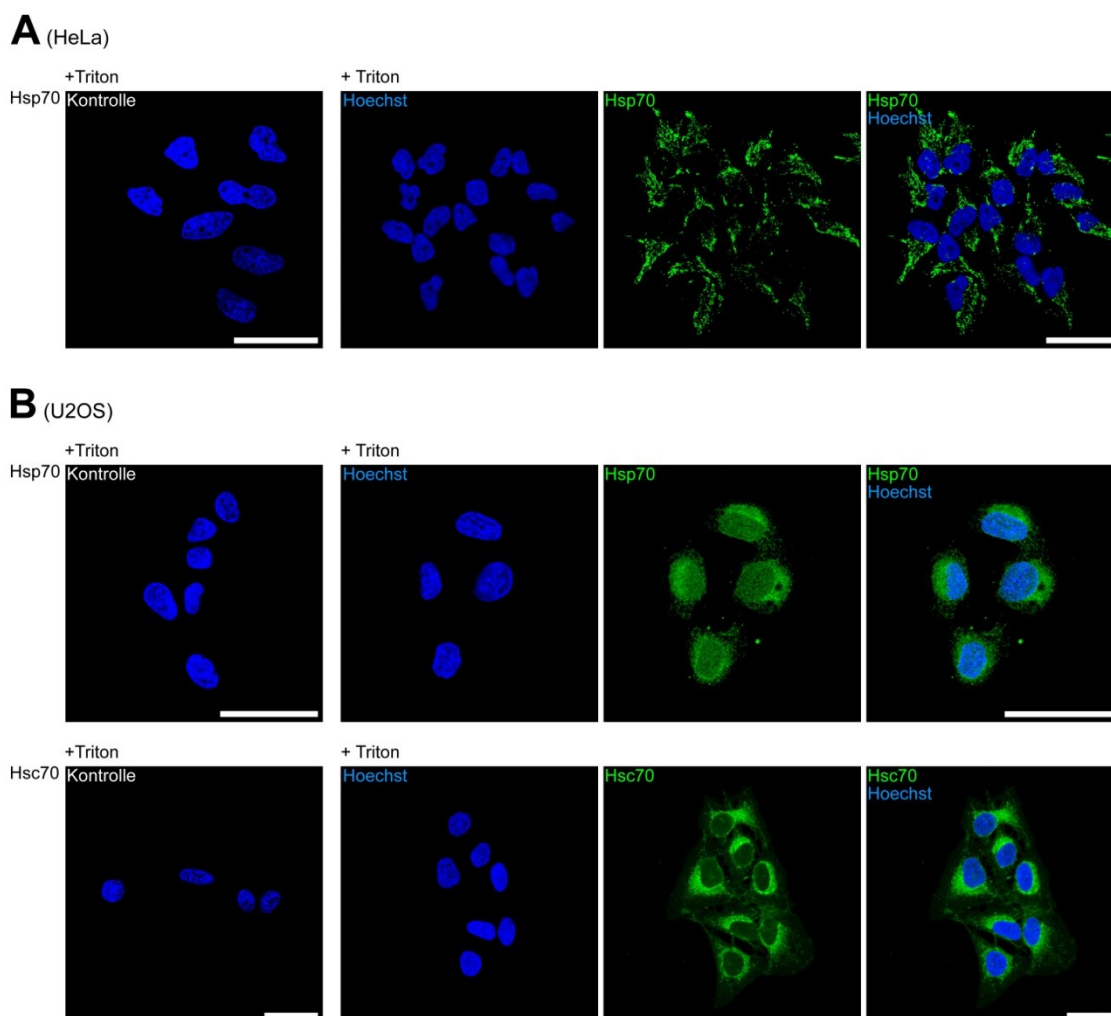
**A** (Caveolin-1)**B** (GAPDH)**C** (LDH)



**D** ( $\alpha$ -Tubulin)**E** (Hsp70)**F** (Hsp70)



**Abbildung 9.11: Ergänzung zu Abbildung 4.13 "Auch immortalisierte HK2-Zellen exprimieren und exponieren Hsp70, GAPDH, LDH und  $\alpha$ -Tubulin in Clustern, die in Form und Größe den Proteinclustern auf den Tumorzellen entsprechen".** Ungestresste (37 °C) und gestresste (44 °C, 25 Minuten, acht Stunden Erholungszeit bei 37 °C) HK2-Zellen geringer (A - F;  $3,0 \times 10^4$  Zellen / Probe) oder hoher Zelldichte (G, H; konfluent) wurden mit (+Triton) oder ohne Permeabilisierung (-Triton) für die Fluoreszenzmarkierung vorbereitet. Die Zielproteine wurden unter Verwendung folgender Kombinationen aus monoklonalen (mAk) beziehungsweise polyklonalen Primärantikörpern (pAk) und entsprechend spezifischen, Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern indirekt immunfluoreszenzmarkiert: (A) Caveolin-1: mAk D46G3, AlexaFluor546; (B) GAPDH: mAk 1D4, AlexaFluor546; (C) LDH: pAk ab7639, AlexaFluor647; (D)  $\alpha$ -Tubulin: mAk sc-53029, AlexaFluor546; (E-H) Hsp70: pAk sc-1060, AlexaFluor647. Die DNS wurde mit Hoechst 33342 gefärbt, die Analyse der fertigen Proben erfolgte mittels eines inversen Fluoreszenzmikroskops (Leica DMI6000B, 63-fach Ölimmersionsobjektiv). Dargestellt sind im Falle der eigentlichen Proben die Einzelbilder der jeweils für Zielprotein (grün) und DNS (blau) genutzten Detektionskanäle, sowie Überlagerungen dieser Einzelbilder der Proben (Zielprotein / Hoechst) und der Negativkontrollen (Kontrolle). Alle Mikroskop- beziehungsweise Softwareeinstellungen wurden zunächst zur Darstellung des jeweiligen Zielproteins in den permeabilisierten Zellen optimiert, falls erforderlich auf die entsprechende Negativkontrolle abgestimmt und im Anschluss ohne jedwede Änderungen für die Analyse der entsprechenden unpermeabilisierten Präparate übernommen. Maßstab: 25  $\mu$ m.



**Abbildung 9.12: In den Zellkernen ungestresster HeLa-Zellen ist Hsp70 nicht detektierbar. In den Kernen ungestresster U2OS-Zellen ist Hsp70 detektierbar, Hsc70 aber kaum nachweisbar.** Ungestresste HeLa- (A) und U2OS-Zellen (B) wurden vor der Fluoreszenzmarkierung permeabilisiert (+Triton). Die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung von Hsp70 erfolgte unter Verwendung des monoklonalen Primärantikörpers sc-59569 sowie eines AlexaFluor647-gekoppelten Sekundärantikörpers, die von Hsc70 mittels des monoklonalen Primärantikörpers ab51052 sowie eines AlexaFluor546-gekoppelten Sekundärantikörpers. Für die Markierung der DNS wurde Hoechst 33342 genutzt. Die Analyse der fertigen Proben erfolgte mittels eines inversen Fluoreszenzmikroskops (Leica DMI6000B, 63-fach Ölimmersionsobjektiv). Dargestellt sind die Einzelbilder der jeweils für Zielprotein (grün) und DNS (blau) genutzten Detektionskanäle sowie Überlagerungen der Einzelbilder der Proben (Zielprotein / Hoechst) und der entsprechenden Negativkontrollen (Kontrolle). Alle Mikroskop- beziehungsweise Softwareeinstellungen wurden zunächst auf Präparate abgestimmt, für deren Herstellung keine Primärantikörper verwendet worden waren (Kontrolle) und im Anschluss ohne Änderungen für die Analyse der mit Primär- und Sekundärantikörpern behandelten Präparate übernommen. Maßstab: 50 µm.

## **9.2 Akademischer Lebenslauf, Veröffentlichung, Tagungsbeitrag**

### **9.2.1 Akademischer Lebenslauf**

Der Arbeit vor Drucklegung der Pflichtexemplare entnommen.

### **9.2.2 Veröffentlichung**

Teile dieser Arbeit sind für folgende Publikation vorgesehen: Schink CW., Hundt W., Jacob R., "*Comparative analysis of stress-induced expression elevation and localization of heat-shock protein 70 kDa (Hsp70) in different human tumor cells: More similarities than differences?*" Das betreffende Manuskript ist in Vorbereitung.

### **9.2.3 Tagungsbeitrag**

Teile dieser Arbeit wurden anlässlich des "*Joint International Symposium on Mechanisms of Cellular Compartmentalization*" des Sonderforschungsbereichs 593 sowie des Graduiertenkollegs 1216 im September 2014 in Marburg in Form folgenden Posters präsentiert: Schink CW., Jacob R., Hundt W. "*The heat shock proteins 70 (HSP70s) in human cancer cells: Similarities and differences in stress response and localization.*"

### **9.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer an den Fachbereichen Biologie, Chemie sowie Physik und Medizin der Philipps-Universität Marburg sowie am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie Marburg waren die Damen und Herren Ackermann, Batschauer, Beck, Bölker, Brandl, Brändle, Bremer, Brune, Buckel, Buttgereit, Conrad, Dienst, Elsässer, Feuser, Galland, Glorius, Grolig, Hassel, Heider, Higgs, Homberg, Hundt, Huntley, Imhof, Jacob, Jagadeesan, Kahmann, Kiekebusch, Kost, Kostron, Krause, Kühn, Lassak, Lee, Lill, Lindow, Lingelbach, Mann, Mörschel, Mösch, Mühlenhoff, Müller, Paulick, Plachter, Peters, Rath, Rebscher, Reh, Rexer, Ried, Schachtner, Schlimpert, Schneider, Schramm, Søgaard-Andersen, Stehling, Straube, Thanbichler, Thormann, Veitinger, von Mach und Ziegenhagen.

## 9.4 Danksagung

Während der Arbeit an den zuvor teilweise beschriebenen Promotionsprojekten wurde ich beständig von einer ganzen Reihe von Personen tatkräftig unterstützt, bei welchen ich mich hiermit herzlich bedanken möchte. Mein besonderer Dank gilt...

...Professor Doktor Ralf Jacob und Professor Doktor Walther Hundt für die Bereitstellung des extrem interessanten Themas, der erforderlichen Mittel und ganz besonders dafür, dass mir die Möglichkeit des "Forschens nach eigenem Ermessen" eingeräumt wurde.

...den aktuellen und ehemaligen Angehörigen der Arbeitsgruppe Jacob (Waltraut Ackermann, Julia Ashoff, Daniel Becker, Sebastian Bänfer, Martina Dienst, Ellena Hönig, Katharina Fritsch, Tobias von Mach, Marcel Reeh, Dominik Schneider, Tamara Straube, Sophie Veitinger, Sabrina Zink) für die herzliche Integration in die Arbeitsgruppe, die Unterstützung bei technischen Herausforderungen, die Bereitstellung von Kaffee, Kuchen und andere Backwaren sowie die Beurteilung meiner Ergebnisse aus humanbiologischen Sicht.

...den noch nicht genannten aktuellen und ehemaligen Angehörigen des Instituts für Klinische Zytobiologie und Zytopathologie beziehungsweise der Arbeitsgruppen Lill und Elsässer sowie dem zumeist "verborgen" agierenden Funktionspersonal (Renate Dreyer, Jutta Kaminski, Volkwin Kramer, Ursula Lehr, Gisela Lesch und Ralf Rösser) für den freundschaftlichen Umgang miteinander, die Unterstützung und die großartige Atmosphäre.

...Stefan Christ unter anderem dafür, dass er sich noch daran erinnern konnte, dass die einzige am Institut vorhandene und vermutlich seit Jahrzehnten unbenutzte große Western-blot-Tanktransferkammer über dem Schreibtisch von Ulrich Mühlenhoff stand.

...Ulrich Mühlenhoff nicht zuletzt für die selbstlose Übereignung der Transferkammer.

...Oliver Stehling etwa für die Unterstützung bei dem Versuch, die von den Tumorzellen abgeschnürten, vermeintlichen großen Onkosomen durchflusszytometrisch zu analysieren.

...Beatrix und Sven Freibert etwa für das Korrekturlesen dieser Arbeit und auch für die (zwar nur in Ausnahmefällen erforderliche, gelegentlich aber tatsächlich notwendige) Korrektur meiner bisweilen etwas zu dramatischen oder zu unkonventionellen Sicht der Dinge.

...meinen Eltern, Geschwistern, Verwandten, bereits erwähnten oder aus Platzmangel nicht namentlich genannten Freunden für die Unterstützung aus der Ferne, die Aufrechterhaltung der Arbeitsmoral und vor allem dafür, dass sie meine projektspezifischen Schimpftiraden stets verständnisvoll, unkommentiert und mit Engelsgeduld über sich ergehen ließen.

## **9.5 Ehrenwörtliche Erklärung**

Der Arbeit vor Drucklegung der Pflichtexemplare entnommen.